Die Aufnahme und subcelluläre Verteilung von Eisen und chemisch verwandten Metallen bei Reticulocyten von Kaninchen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jürgen Simon

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. W. Rummel

DIE AUFNAHME UND SUBCELLULÄRE VERTEILUNG VON EISEN UND CHEMISCH VERWANDTEN METALLEN BEI RETICULOCYTEN VON KANINCHEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Jürgen Simon

1970

Dekan: Prof. Dr. H. Kulenkampff

Referent: Prof. Dr. W. Forth

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 11.2.71 abgelegt.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

und meiner Frau.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) ZUSAMMENFASSUNG	1
B) EINLEITUNG	3
C) METHODEN	7
D) ERGEBNISSE	
1. Aufnahme und intracelluläre Verteilung von Eisen und chemisch verwandten Biometallen bei roten Blutzellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen	15-34
a) Eisen	15
b) Mangan	19
c) Kobalt	22
d) Zink	25
e) Kupfer	28
f) Chrom	31
2. Die Hemmung der Aufnahme von Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen in Gegenwart chemisch verwandter Biometalle und vice versa die Hemmung der Aufnahme der Biometalle durch Eisen.	35-44
a) Eisen und Mangan	
b) Eisen und Kobalt	
c) Eisen und Zink	
3. Intracelluläre Verteilung von Eisen und chemisch verwandten Biometallen bei wechselseitiger Hemmung	45-52
a) Eisen und Kobalt	45
b) Eisen und Zink	48
E) DISKUSSION	53

F) TABELLENANHANG
Tabellen I - XIII

G) LITERATURVERZEICHNIS

H) LEBENSLAUF

A) ZUSAMMENFASSUNG

1. In vitro wurde an roten Blutzellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen die Aufnahme und subcelluläre Verteilung von Fe, Mn, Co, Cu, Zn und Cr untersucht. Die roten Blutzellen stammten von Kaninchen, bei denen die Zahl der Reticulocyten durch wiederholte Aderlässe vergrößert wurde. Die Blutzellen wurden in einem künstlichen Medium aus Tyrodelösung und Polyoxygelatine (1:1) inkubiert. Die subcellulären Fraktionen - Stromafraktion, proteinfreie Zellflüssigkeit, Globin- und Hämfraktion - wurden mit Hilfe der fraktionierten Aussalzung mit Ammoniumsulfat gewonnen.

2. Reticulocyten nehmen wie Eisen auch Zink, Mangan und Kobalt auf, nicht jedoch Chrom und Kupfer. Die roten Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen enthielten vom angebotenen Kupfer sogar weniger als diejenigen der normalen Suspensionen. Wie für Eisen ergab die Prüfung der Verteilung auch für die Metalle, die von den Reticulocyten aufgenommen werden, eine Bindung in der Membran und eine Überführung in die Hämfraktion. Diese Befunde deuten darauf hin, daß Zink, Mangan und Kobalt bei der Aufnahme in die Reticulocyten den gleichen Weg benutzen wie Eisen.

3. Wenn diese Annahme zutrifft, dann sollte es möglich sein, eine wechselseitige Konkurrenz bei der Aufnahme von Eisen, Zink, Mangan und Kobalt nachzuweisen. Das ist auch tatsächlich der Fall. Dabei erweist sich Eisen als der stärkste Inhibitor. Die Konzentrationen von Eisen, die zur Hemmung der Aufnahme von Zink, Mangan und Kobalt um etwa die Hälfte ausreichen, betragen nur 1/5, 1/10 bzw. 1/15 derjenigen, die von den genannten Metallen für die Hemmung der Aufnahme von Eisen um den gleichen Betrag aufgewendet werden müssen.

4. Bei der wechselseitigen Hemmung der Aufnahme von Eisen und Zink, bzw. Eisen und Kobalt zeigt die Verteilung der Metalle auf die subcellulären Fraktionen einige Besonderheiten.
Bei der Hemmung der Eisenaufnahme durch Zink und Kobalt ist vor allem der Einbau von Eisen ins Protoporphyrin betroffen. Dagegen ist bei der Hemmung der Aufnahme von Zink und Kobalt durch Eisen in erster Linie die Bindung der Metalle in der Membran bzw. die Inkorporation der Metalle ins Zellinnere verringert.

5. Die Ergebnisse lassen sich plausibel interpretieren, wenn man annimmt, daß in der Membran der Reculocyten ein System lokalisiert ist, das Eisen mit hoher Spezifität bindet, und das für die Einschleusung des Eisens ins Zellinnere eine Rolle spielt.
Chemisch verwandte Metalle wie Kobalt, Mangan und sogar Zink können offenbar mit diesen Acceptorstellen in Verbindung treten und werden gewissermaßen mit Eisen verwechselt; das gilt nicht für Chrom und Kupfer.

B) EINLEITUNG

Bei der eingehenden Untersuchung der Eisenaufnahme durch die unreifen Vorstufen roter Blutzellen, der Reticulocyten, wurde festgestellt, daß diese Zellen Eisen nicht nur rasch ins Häm einbauen - sie sind zur Synthese von Hämoglobin befähigt (Lit. siehe bei KATZ und JANDL 1964) - sondern Eisen vor allem in der Zellmembran in größerem Umfange binden als normale ausgereifte Erythrocyten. Die im Vergleich mit Erythrocyten gesteigerte Fähigkeit der Reticulocyten, Eisen in der Zellmembran zu binden, tritt vor allem dann in Erscheinung, wenn das Eisen komplexgebunden angeboten wird. Der Zellmembran der Reticulocyten, die die erste Kontaktstelle der Zelle für Eisen darstellt und offensichtlich Acceptorstellen für dieses Metall enthält, kommt demnach eine besondere Bedeutung bei der Aufnahme von Eisen in die Zellen zu (ALLEN et JANDL 1960, JANDL et al. 1959, JANDL et KATZ 1963, FORTH et al. 1967, CRÜSEMANN 1968).

Zur Eisenaufnahme in die Reticulocyten existiert offenbar eine Parallele im transzellulären Transfer von Eisen durch die Mucosazellen des Darmes (Lit. siehe bei FORTH 1970). Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Mangelzustand vermehrt Eisen aufnehmen und binden können als normalerweise. Zur Stunde kann allerdings noch nichts sicheres darüber gesagt werden, in welchen Teilen der Zelle die vermehrte Bindung von Eisen vor sich geht; in den Microvilli der lumenwärts gerichteten Zellmembran - an die man zunächst denkt - ist es offensichtlich nicht, wie Untersuchungen mit isolierten brush borders in vitro ergaben (GREENBERGER 1968, LEOPOLD et al. 1968). Die Mucosazellen von Tieren, die an Eisen verarmt sind, sind wie die Reticulocyten in der Lage, Eisen

auch aus Komplexen aufzunehmen und zu verwerten, das heißt in diesem Falle, durch die Zelle zur Blutseite hin zu transferieren.

Wenn man davon ausgeht, daß in beiden Fällen, bei den Reticulocyten wie bei den Mucosazellen, Acceptorstellen für Eisen existieren, die für die Aufnahme in die Zellen bzw. den transzellulären Transport von Eisen eine besondere Rolle spielen, dann erhebt sich die Frage nach der Spezifität dieser Acceptorstellen für Eisen. Für die Mucosazellen ist diese Frage mittlerweile beantwortet: Im Vergleich zu der Aufnahme und Durchschleusung von chemisch verwandten Metallen zeigt die Mucosazelle die höchste Spezifität für Eisen (FORTH 1966, 1970).

Die Frage nach der Spezifität der Aufnahme von Eisen hat für Reticulocyten insofern eine besondere Bedeutung, als die reifen roten Blutzellen, so weit heute bekannt, nur den Eisen-Porphyrin-Komplex (Häm) enthalten, obgleich dem Biochemiker Porphyrinkomplexe mit allen wichtigen Biometallen, z. B. mit Kobalt, Nickel, Zink oder Kupfer bekannt sind (MARTELL 1958). Es liegt nahe, davon auszugehen, daß beim enzymatisch gesteuerten Einbau in den Porphyrinring Eisen bevorzugt wird. Denkbar ist aber auch, daß bereits bei dem vorhergehenden Prozess der Aufnahme in die Zelle Eisen eine Sonderstellung einnimmt. Ausschließlich dieser Frage, nämlich ob Eisen schon bei der Aufnahme in die Reticulocyten gegenüber chemisch verwandten Biometallen bevorzugt wird, ist die vorliegende Arbeit gewidmet.

Zur Prüfung dieser Frage wurde zunächst die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Eisen und ihm chemisch verwandter Metalle wie Kobalt und Mangan, der ferner stehenden Metalle Kupfer und Zink sowie

von Chrom in die roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen aus Kaninchenblut geprüft.

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Metalle in den roten Blutzellen wurde ein bereits erprobtes Verfahren zur fraktionierten Aussalzung mit Ammoniumsulfat benutzt (CRÜSEMANN 1968), das es erlaubt, vor allem die Zellmembranen und das Häm der roten Zellen abzutrennen; dabei fallen als weitere Fraktionen, die im Zusammenhang mit den hier interessierenden Fragen von untergeordneter Bedeutung sind, die proteinfreie Zellflüssigkeit und die Globinfraktion an.

Eine weitere Untersuchungsreihe diente der Aufklärung der Frage, ob die chemisch dem Eisen nahestehenden Biometalle Kobalt, Mangan und auch das fernerstehende Zink mit der Aufnahme von Eisen in die Reticulocyten interferieren bzw. ob umgekehrt Eisen die Aufnahme der genannten Metalle beeinträchtigt. Auch in dieser Versuchsreihe wurde die intrazelluläre Verteilung der Metalle auf die erwähnten vier Fraktionen geprüft. Diese Untersuchungen wurden auf die Metalle Eisen, Kobalt und Zink beschränkt.

Die Untersuchungen wurden mit radioaktiv markierten Metallen durchgeführt. Die Blutzellen wurden in einem künstlichen Medium aus Polyoxygelatine- und Tyrodelösung suspendiert, um eine Interferenz mit dem spezifisch Eisen bindenden - aber auch mit einer Reihe anderer Biometalle reagierenden (HOPKINS et SCHWARZ 1964, PERKINS 1966) - Protein des Plasmas, dem Transferrin, mit den Resultaten zu vermeiden.

In einer vorausgehenden Publikation wurde bereits festgestellt, daß zwischen der Eisenaufnahme durch Reticulocyten im künstlichen Medium und derjenigen

im Plasma, das heißt in Gegenwart von Transferrin, kein prinzipieller Unterschied existiert (FORTH et al. 1967, CRÜSEMANN 1968).

C) METHODEN

1. Herstellung normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.

Kaninchen (weiblich, durchschnittliches Körpergewicht 3-4 kg) wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen aus den Ohrgefäßen entblutet (50 ml/Aderlaß). Mit den Erythrocyten der ersten Blutentnahme wurden jeweils normale Suspensionen bereitet. Die Zahl der roten Blutkörperchen belief sich hierbei auf 5,63 Millionen/mm^3 (σ = ±0,56; n = 10).
Nach vier Aderlässen hatte das Blut, das zur Bereitung der reticulocytenreichen Suspensionen benutzt wurde, eine Erythrocytenzahl von 1,96 Mill./mm^3 (σ = ±0,53; n = 9).
Die Reticulocytenzahl des Blutes (Färbung mit Brillantkresylblau) pro 1000 Erythrocyten stieg von 8 (σ = ±3,6; n = 10), im Blut der ersten Entnahme, auf 46 (σ = ±13; n = 9) im Blut der letzten Entnahme an.
Bei der Entnahme wurde das Blut heparinisiert und anschließend viermal mit dem zehnfachen Volumen kalter (4°C), physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem vierten Waschen wurden die Erythrocyten in einem künstlichen Medium bei 37°C suspendiert, das wie folgt zusammengesetzt ist: Tyrodelösung und 4%ige Polyoxygelatinelösung (Hämaccel, Fa. Behring - Werke, Marburg/Lahn) im Verhältnis 1 : 1 gemischt.
Der Hämatokrit der Suspensionen betrug durchschnittlich 23 % (σ = ±1; n = 200). Die Erythrocytenzahlen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen waren annähernd gleich groß:
Normale Suspensionen: 3,32 Millionen/mm^3 (σ = ±0,25; n = 8)
Reticulocytenreiche Suspensionen: 3,41 Millionen/mm^3 (σ = ±0,15; n = 8).

Die Zahlen der roten Blutzellen pro mm^3 normaler bzw. reticulocytenreicher Suspensionen sind statistisch gesichert nicht voneinander verschieden. Daraus kann gefolgert werden, daß bei gleichem Hämatokrit der Zellsuspensionen eventuelle Unterschiede, die sich für die Aufnahme der Metalle ergeben, nicht a Konto einer Volumenänderung der Zellen in den beiden Suspensionen gehen kann.

2. Zusatz der Metalle

Die für die angegebenen Konzentrationen in 10 ml Blutsuspension nötigen Metallmengen wurden in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung mit Salzsäurezusatz (0,01 n) gelöst zugesetzt. Die Metalle waren radioaktiv markiert. Die verwendeten Isotope und Träger sind der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen.

Isotop	inaktiver Träger	Zusatz
^{59}Fe	$FeCl_3$	Citronensäure in 10-fachem Überschuß über Fe
^{54}Mn	$MnCl_2$	- - - -
^{60}Co	$CoCl_2$	- - - -
^{65}Zn	$ZnCl_2$	- - - -
^{64}Cu	$CuSO_4$	- - - -
^{51}Cr	$CrCl_3$	- - - -

Mit Ausnahme von Eisen wurden alle Metalle ohne Komplexbildner dem Suspensionsmedium zugesetzt. Der Citronensäurezusatz zum Eisen dient zur Verhinderung der Bildung von schwerlöslichem Ferrioxydhydrat, das sich auf der Oberfläche der roten Blutzellen niederschlägt und das Studium der Aufnahme in die Zellen unmöglich macht (CRÜSEMANN 1968).

In der Regel wurden die Metalle in einer Konzentration von 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium verwendet. In dieser Konzentration, $1{,}3 \times 10^{-6}$ Mol/l, zeigen die Metalle unter bestimmten Bedingungen, gemessen an der Abkürzung der Hämolysezeit unter der Einwirkung von Urethan, Schwermetallwirkungen (RUGE et RUMMEL 1953). Im Gegensatz zu dem salinischen Inkubationsmedium dieser Autoren wird hier ein Medium mit Polyoxygelatine benutzt, die Metalle bindet. Deshalb können die von RUGE und RUMMEL (1953) ermittelten Grenzkonzentrationen für eine eventuelle Schwermetallwirkung an den roten Blutzellen nicht auf die hier herrschenden Bedingungen übertragen werden. In keinem Fall wurde unter den hier benutzten Versuchsbedingungen eine sicht- oder meßbare Hämolyse beobachtet, nicht einmal in den Hemmversuchen, in denen die Metallkonzentration z. B. für Zink 2×10^{-3} Mol/l und für Kobalt sogar $5{,}2 \times 10^{-3}$ Mol/l betrug.
Der pH - Wert der Blutsuspension betrug 7,0.

3. Fraktionierung der roten Blutzellen

Jeweils 2 ml wurden aus der bei 37°C inkubierten Blutsuspension entnommen.
Die roten Zellen dieser Proben wurden mit dem 20-fachen Volumen an kalter (4°C), physiologischer Kochsalzlösung (Tris-gepuffert, pH = 7,5) gewaschen. Hiernach wurde die Radioaktivität der Zellen gemessen (Gesamtaufnahme in die roten Blutzellen).
Die Fraktionierung der roten Zellen lehnt sich im wesentlichen an das von KRUH und BORSOOK 1956 beschriebene Vorgehen an mit dem Unterschied, daß zur Aussalzung der Proteine hier statt Phosphat Ammoniumsulfat benutzt wurde, und daß die Trennung von Hämoglobin in Häm und Globin nach einem von TEALE 1959 beschriebenen Verfahren durchgeführt wurde.

Durch Zusatz von 7 ml Tris-gepufferten aqua dest. (pH = 7,4) wurden die roten Zellen hämolysiert. Nach 30 Minuten wurden die unlöslichen Proteine durch Zusatz von soviel Ammoniumsulfat gefällt, daß die Konzentration im Hämolysat 2,75 Mol/l betrug. Der Niederschlag wurde mit einer Ultrazentrifuge (Spinco L 50 der Fa. Beckman, USA) abzentrifugiert (30 Minuten; 70 000 x g). Der Überstand wurde dekantiert und die Radioaktivität des Niederschlags gemessen. Die Fraktion, die im wesentlichen die Stromata der roten Blutzellen und partikuläre Bestandteile, wie Mitochondrien und Mikrosomen - soweit in den unreifen Vorstufen der roten Zellen vorhanden - enthält, wird im folgenden "Stromafraktion" genannt.

Sie enthielt durchschnittlich nicht mehr als 4 % des Gesamthämoglobingehaltes der roten Blutzellen, die in 2 ml Suspension enthalten waren (σ = ±0,4; n = 450).

Zur Ausfällung der nicht partikulären, löslichen Proteine wurde die Konzentration von Ammoniumsulfat im Überstand über den Stromata auf 4,1 Mol/l erhöht und die Proben über Nacht (16 - 18 Stunden) bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

In dieser Zeit fielen die löslichen Proteine aus, von denen das Hämoglobin über 95 % ausmacht.

Der Niederschlag wurde mit einer MSE "Super Speed 25" Zentrifuge (Fa. MSE, London, England) abzentrifugiert (30 Minuten; 30 000 x g).

Der Überstand wurde volumetrisch erfaßt und die Radioaktivität gemessen. Diese Fraktion wird im folgenden "Zellflüssigkeit" genannt. In ihr waren weder durch Säurezusatz noch durch die Kochprobe Eiweiß nachzuweisen.

Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in 12 ml Tris-gepufferten Wassers (pH = 7,4) gelöst und in Dialysierschläuche abgefüllt (ϕ 16 mm, Fa. Kalle Wiesbaden - Bieberich). Die gefüllten Schläuche ver-

blieben 1 Stunde in einem Wasserbad (4 l) mit 1 g Kaliumhexacyanoferrat-(III) zur Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin, was die vollständige Trennung von Häm und Globin ermöglicht (TEALE 1959).
Nach einer 16 - 18 stündigen Dialyse gegen fließendes Leitungswasser zur Entfernung des Ammoniumsulfats (ein Zusatz von Bariumsulfat zum Inhalt der Dialysierschläuche ergab keine Trübung mehr) wurde der Inhalt der Schläuche in Reagenzgläser gefüllt und mit 1 ml 1 n HCl versehen.
Die Dialyse des gelösten Hämoglobins bzw. der löslichen Zellproteine ist der einzige Arbeitsgang in der Fraktionierung, bei dem nennenswerte Anteile der Radioaktivität verloren gehen könnten. Die insgesamt in den Zellen wiedergefundene Radioaktivität ist jeweils in % der insgesamt aufgenommenen in den Tabellen verzeichnet.
Im Durchschnitt wurden 80 % der Gesamtaktivität der roten Blutzellen in den vier Zellfraktionen wiedergefunden, d. h. daß der größte Teil sehr fest gebunden ist!

Anschließend wurde diese Flüssigkeit mit 2 x 15 ml Methyl-Äthylketon (für chromatographische Zwecke, Fa. Merck, Darmstadt) im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Dabei geht Häm in die organische Phase über und der Eiweißanteil bleibt in der gelblich gefärbten wässrigen Phase zurück.
Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuumrotationsverdampfer (Fa. Büchi) zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ml Pyridin (p. a., Fa. Merck, Darmstadt) aufgenommen und die Radioaktivität gemessen. Diese Fraktion wird im folgenden als "Hämfraktion" bezeichnet.
Das Volumen der wässrigen Phase wurde bestimmt und die Radioaktivität gemessen. Sie enthält in erster Linie das Globin der roten Zellen aber auch ihre leichtlöslichen Proteine (Enzyme). Sie wird als "Globinfraktion" bezeichnet.

Während der drei Tage dauernden Fraktionierung fand keine meßbare Umverteilung der Radioaktivität statt. Einzelheiten der Methode wurden bereits anderenorts publiziert (CRÜSEMANN 1968).

4. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der roten Blutzellen und der vier Fraktionen wurde in einem NaJ-Bohrlochkristall *) (Fa. Friesecke und Höpfner, FH 421, Erlangen - Bruck) gemessen. Als Standard diente die Radioaktivität in 2 ml der Suspension.
Die Meßergebnisse wurden an Hand des Standards in % der gesamten angebotenen Aktivitätsmenge umgerechnet.

*) Herrn Prof. Dr. R. Stämpfli sei an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Gerätes gedankt.

5. Anmerkungen zur Methode

Zur Beurteilung der Ergebnisse, die mit der Aussalzung der verschiedenen subzellulären Fraktionen gewonnen wurden, muß man sich vor Augen halten, daß die Stromafraktion zwar im wesentlichen aus den Membranen der hämolysierten Zellen besteht, daß sie aber auch andere partikuläre Elemente aus den schwerlöslichen Proteinen enthält: nämlich Mitochondrien und Ribosomen, die ausschließlich in den Reticulocyten enthalten sind. Aus der zuletzt genannten Tatsache könnte gefolgert werden, daß z. B. Unterschiede hinsichtlich des ^{59}Fe-Gehaltes der Stromafraktion von Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen garnicht durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Zellmembranen verursacht werden, sondern die Folge des unterschiedlichen Gehaltes an partikulären Elementen der Zellen beider Suspensionen sind, insbesondere des Gehaltes an Mitochondrien. Sie enthalten aller Wahrscheinlichkeit nach, wie diejenigen von Leberzellen (RIMINGTON 1958, NEVE 1962, NISHIDA & LABBE 1959, LABBE & HUBBARD 1960), das Enzym bzw. Enzymsystem, das für den Einbau von ^{59}Fe ins Häm verantwortlich ist. Der Literatur kann indes entnommen werden, daß die Mitochondrien von Reticulocyten nur zwischen 5 und 6 % der in der Partikelfraktion von Reticulocyten insgesamt enthaltenen ^{59}Fe-Aktivität enthalten. Dieser Prozentsatz bleibt während der Inkubationszeit von fast 70 Minuten unverändert (ALLEN & JANDL 1960). Den Daten dieser Autoren kann entnommen werden, daß der Hauptteil der ^{59}Fe-Aktivität in den Partikelfraktionen von Reticulocyten in den Zellmembranen vorliegt.

Die Stromafraktion enthält außerdem Hämoglobin; im Durchschnitt macht sein Anteil in der Stromafraktion der für jede Zellfraktionierung bestimmt wurde, nicht mehr als 4 % des insgesamt in den fraktionierten

Zellen gemessenen Hämoglobins aus ($n = 450$; $\sigma = \pm 0{,}4$). Daraus folgt, daß der ^{59}Fe-Gehalt in der Stromafraktion um den Betrag, der eigentlich der Hämfraktion zuzurechnen wäre, zu hoch veranschlagt wird. Da die Abweichungen, die sich ergeben, selbst bei den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen sehr gering sind, wurden die Werte nicht korrigiert. Das Hämoglobin der Stromafraktion ist eine durch die Methode des Aussalzens bedingte Verunreinigung und stellt nicht etwa einen normalen Bestandteil der Zellmembranen der roten Blutzellen dar (WEED, REED and BERG 1962).

Ebenfalls bedingt durch die Methode der fraktionierten Aussalzung enthält die Globinfraktion zwar ganz überwiegend Globin - über 98 % der löslichen Zellproteine der roten Blutzellen entfallen auf Globin (HARRIS 1963) - aber auch die restlichen anderen löslichen Zellproteine, insbesondere Enzymproteine.

Diese methodisch- kritischen Überlegungen sollen verhindern, sich zu allzu detaillierten Schlußfolgerungen bei Betrachtung der folgenden Ergebnisse aufgrund der Fraktionsbezeichnungen verleiten zu lassen. Zuvor sind im Einzelfall noch weitere Untersuchungen notwendig unter Zuhilfenahme von Methoden, die eine schärfere Trennung der Zellen in die einzelnen Bestandteile zulassen.
Der Vorteil der hier verwendeten einfachen Methode der fraktionierten Aussalzung liegt auf der Hand: Sie ermöglicht mit geringem apparativen Aufwand in kurzer Zeit größere Reihenversuche, die statistisch relevante Ergebnisse erbringen.

D) ERGEBNISSE

1. Aufnahme und intracelluläre Verteilung von Eisen und chemisch verwandten Biometallen bei roten Blutzellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.

Zur Prüfung der Frage, ob Eisen bereits bei der Aufnahme in die unreifen Vorstufen der roten Blutzellen eine Sonderstellung einnimmt, oder ob es erst beim Einbau ins Protoporphyrin spezifisch bevorzugt wird, wurden rote Blutzellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen mit verschiedenen Metallen inkubiert. In diesen Versuchen wurde die Aufnahme und intracelluläre Verteilung der radioaktiv markierten Metalle gemessen. Neben den dem Eisen chemisch verwandten Kobalt und Mangan wurden die Biometalle Zink und Kupfer, sowie Chrom zum Vergleich in die Untersuchungen miteinbezogen.
Die Metalle wurden in einer Konzentration von 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium, vermischt mit Radioisotopen, dem Inkubationsmedium zugesetzt.
(vergl. Methode Seite 8)

a) Eisenaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten normaler und reticulocytenreicher Suspensionen

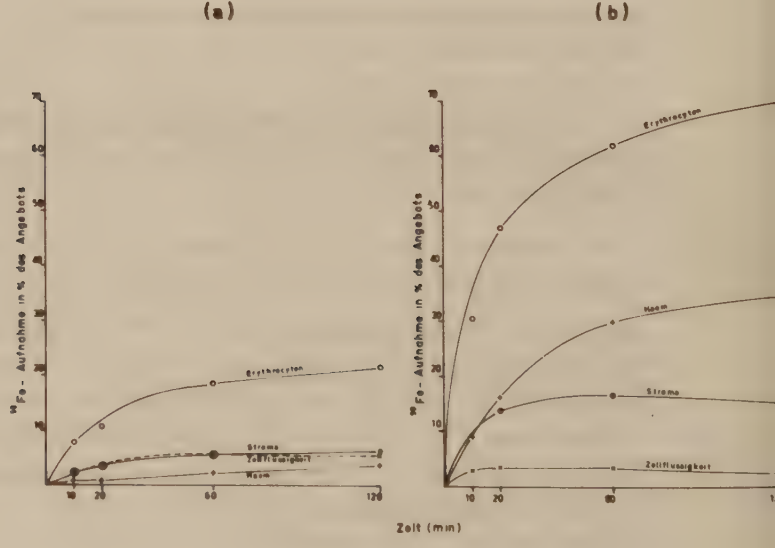
Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle I zusammengefaßt und in Abb. I graphisch dargestellt.

Die Abb. I läßt erkennen, daß die ^{59}Fe-Aufnahme in rote Zellen normaler Suspensionen in der ersten Phase rasch und in der zweiten langsam zunimmt. Nach 120 Minuten sind 21,6 % der angebotenen Radioaktivität aufgenommen. Die ^{59}Fe-Aufnahme in die Stromafraktion und die Zellflüssigkeit zeigt den gleichen zweiphasigen Verlauf. Die Aufnahme von ^{59}Fe in die

Abb. I

^{59}Fe-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen in transferrinfreiem Medium

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium mit Citronensäure in 10-fachem Überschuß.
Ordinate: Fe-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x) und der Haemfraktion (+) in % des Angebots.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 bis 12 Einzelversuchen (vgl. Tab. I).



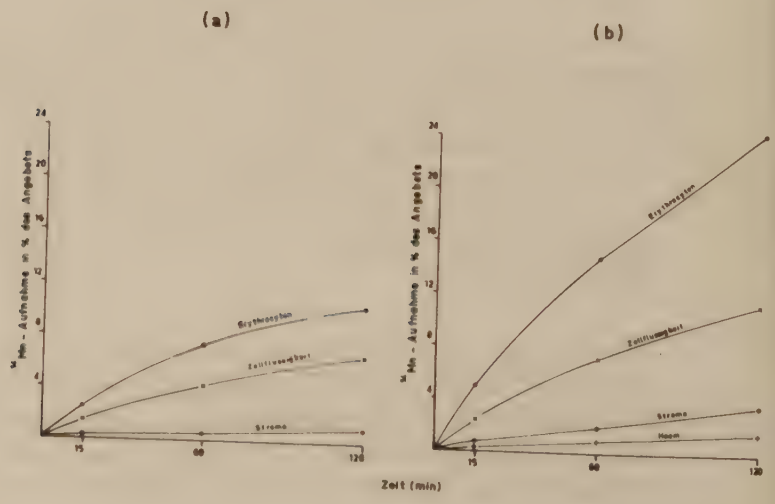
Hämfraktion verläuft nahezu linear. Nach 120 Minuten sind in der Stromafraktion 31,5 %, in der Zellflüssigkeit 26,4 % und in der Hämfraktion 16,4 % des insgesamt aufgenommenen radioaktiven Eisens enthalten. Rote Zellen reticulocytenreicher Suspensionen zeigen ebenfalls einen zweiphasigen Verlauf der Aufnahme der ^{59}Fe-Aktivität. Die roten Blutzellen dieser Suspension nehmen ^{59}Fe nicht nur schneller sondern auch in erheblich größerem Umfange als die Zellen normaler Suspensionen auf. So enthalten die roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen nach 10 Minuten das 1,4-fache und nach 20 Minuten das 2,2-fache der ^{59}Fe-Menge, die rote Zellen normaler Suspensionen im gleichen Zeitraum aufgenommen haben. Nach 120 Minuten sind 70 % der angebotenen ^{59}Fe-Aktivität in den Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen enthalten, das heißt, das 3,2-fache des Wertes normaler Suspensionen. Die ^{59}Fe-Aufnahme in die Stromafraktion zeigt anfangs einen raschen Anstieg, der sich zwischen 20 und 60 Minuten verlangsamt und der zwischen 60 Minuten und dem Versuchsende leicht abnimmt. Nach 120 Minuten enthält die Stromafraktion dieser Zellen rund 1/5 der insgesamt aufgenommenen ^{59}Fe-Aktivität. Die Aufnahme von ^{59}Fe in die Zellflüssigkeit hat nach 10 - 20 Min. ihren höchsten Wert erreicht. Die ^{59}Fe-Aktivität dieser Fraktion beträgt nach 120 Minuten nur 3,4 % der insgesamt aufgenommenen Menge. Die Aufnahme von Radioaktivität in die Hämfraktion steigt zuerst bis 20 Minuten steil an und verlangsamt sich dann bis zum Versuchsende. Die ^{59}Fe-Aktivität der Hämfraktion beläuft sich am Versuchsende auf rund 50 % der Gesamtaufnahme.

Das Ergebnis dieser Versuche bestätigt die bekannte Tatsache, daß die roten Zellen reticulocytenreicher Blutsuspensionen mehr und schneller Eisen aufnehmen als die Zellen normaler Suspensionen. Am Versuchsende enthalten die Zellen der reticulocytenreichen Sus-

Abb. II

^{54}Mn-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Manganangebot: ^{54}Mn ($MnCl_2$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.
Ordinate: Mn-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x) und der Haemfraktion (+) in % des Angebots. Die ^{54}Mn-Aktivität der Haemfraktion normaler Suspensionen ist in diesem Maßstab graphisch nicht darstellbar.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 3 bis 8 Einzelversuchen (vgl. Tab. II).



pensionen 3,2 mal mehr ^{59}Fe-Aktivität als die normalen Zellen. In der Stromafraktion der Zellen reticulocytenreicher Suspensionen wurde 2,3 mal mehr und in der Hämfraktion sogar 10 mal mehr ^{59}Fe gemessen als in den gleichen Fraktionen der Zellen normaler Suspensionen.

b) Manganaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. II zusammengefaßt und in Abb. II graphisch dargestellt.

Die ^{54}Mn-Aufnahme in rote Zellen normaler Suspensionen steigt stetig an und ist nach 120 Minuten noch nicht abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt sind 10,3 % der angebotenen Radioaktivität aufgenommen worden; das ist die Hälfte der von ^{59}Fe aufgenommenen Menge.
In die Hämfraktion wird ^{54}Mn nur wenig aufgenommen. Am Versuchsende beträgt der Anteil zu der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität um 1,3 %. (vgl. Tab. 1)
Auch auf die Globinfraktion entfällt nur ein geringer Anteil der insgesamt aufgenommenen ^{54}Mn-Aktivität, nämlich nach 2 Stunden nur 1 %.
Der Hauptteil der ^{54}Mn-Aktivität der roten Blutzellen wurde in der Zellflüssigkeit gefunden. Am Versuchsende beträgt die ^{54}Mn-Aktivität dieser Fraktion 64 % der insgesamt aufgenommenen Menge. Demgegenüber ist auch die Aufnahme von ^{54}Mn in die Stromafraktion gering; am Versuchsende macht sie rund 11 % der insgesamt aufgenommenen ^{54}Mn- Aktivität aus.
Die roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen nehmen auch ^{54}Mn schneller und vermehrt auf als die Zellen der Kontrollsuspensionen. Bemerkenswert ist, daß nach 120 Minuten die ^{54}Mn-Aufnahme offensichtlich noch nicht abgeschlossen ist; die Kurve der ^{54}Mn-Aufnahme zeigt weiterhin einen steilen Anstieg.

Verglichen mit den Zellen der normalen Suspensionen enthalten die Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen am Versuchsende 2,3 mal mehr ^{54}Mn-Aktivität. Auch bei den Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen findet sich der Hauptteil der ^{54}Mn-Aktivität in der Zellflüssigkeit; er macht rund 47 % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität aus. Dann folgt die Stromafraktion mit 15,3 %, die Hämfraktion mit 6 % und die Globinfraktion zeigt den geringsten Wert. (vgl. Tab. 1)

Tab. 1: Vergleich der Verteilung von ^{59}Fe und ^{54}Mn in den roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität nach 2 Stunden.

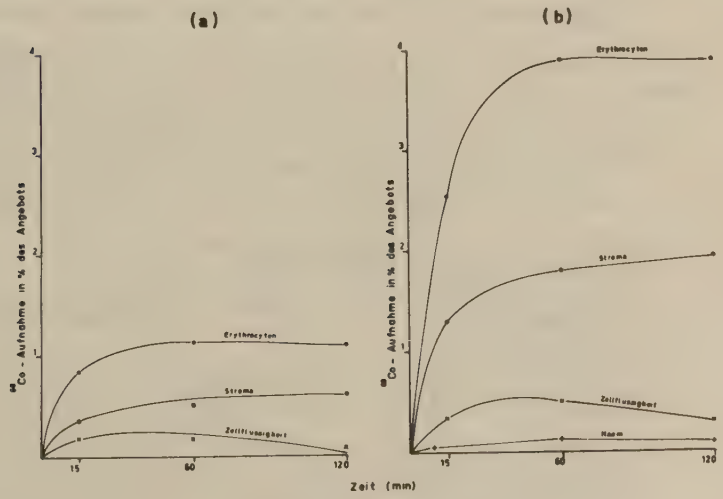
	normale Susp.		reticulocytenr. Susp.	
Fraktionen	^{59}Fe	^{54}Mn	^{59}Fe	^{54}Mn
Stroma	31,5	10,9	22,2	15,3
Zellfl.	26,4	64	3,4	46,6
Globin	3,7	1	1,1	3,5
Häm	16,4	1,3	49,5	6

Die ^{54}Mn-Menge ist in der Zellflüssigkeit reticulocytenreicher Suspensionen 1,7 mal, in der Stromafraktion 1,3 mal und in der Hämfraktion 10,3 mal größer als diejenige in den gleichen Fraktionen der Kontrollversuche.

Abb. III

^{60}Co-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Kobaltangebot: ^{60}Co ($CoCl_2$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmeium.
Ordinate: Co-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (●), der Zellflüssigkeit (x) und der Haemfraktion (+) in % des Angebots. Die ^{60}Co-Aktivität der Haemfraktion normaler Suspensionen ist in diesem Maßstab graphisch nicht darstellbar.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 3 bis 7 Einzelversuchen (vgl. Tab. III).



Vergleicht man die ^{54}Mn-Aufnahme und Verteilung mit der von ^{59}Fe, dann kann folgendes festgestellt werden:
1. Die ^{54}Mn-Aufnahme ist geringer als diejenige von ^{59}Fe. Bei den Zellen normaler Suspensionen ist im Durchschnitt rund die Hälfte und bei den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen ca. 1/3 der ^{59}Fe-Menge an ^{54}Mn inkorporiert worden.
2. Wie ^{59}Fe wird auch ^{54}Mn von den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen vermehrt aufgenommen.
3. Wie ^{59}Fe wird auch ^{54}Mn vermehrt in die Zellmembran und in das Häm der roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen aufgenommen im Vergleich mit den Werten der normalen Suspensionen.
4. Die vermehrt inkorporierte ^{54}Mn-Menge findet sich im Unterschied von derjenigen von ^{59}Fe zum größten Teil in der proteinfreien Zellflüssigkeit.

c) Kobaltaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten normaler und reticulocytenreicher Suspensionen

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. III zusammengestellt und in Abb. III graphisch dargestellt.

Bemerkenswert ist die geringe Aufnahme von ^{60}Co in die roten Zellen. Die Zellen normaler Suspensionen haben nach 120 Minuten nur 1,1 % der angebotenen ^{60}Co-Aktivität aufgenommen. Die Aufnahme erfolgt schnell und scheint nach 60 Minuten abgeschlossen zu sein. Auf die Stromafraktion entfallen von der insgesamt inkorporierten ^{60}Co-Aktivität 54,5 %, auf die Zellflüssigkeit 7,4 % und auf die Hämfraktion 1,4 %. (vgl. Tab. 2)
Die roten Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen haben im Vergleich mit den Zellen der Kontrollversuche 3,5 mal mehr ^{60}Co aufgenommen. Auch in diesen Versuchen scheint die ^{60}Co-Aufnahme nach 60 Minuten bereits abgeschlossen zu sein. Zwischen 60 und 120 Minuten nimmt die Radioaktivität in den Zellen nicht mehr weiter zu.

Der Hauptteil der Radioaktivität entfällt auch hier auf die Stromafraktion, dann folgen die Globinfraktion, die Zellflüssigkeit und die Haemfraktion (vgl. Tab. 2)

Tab. 2: Vergleich der Verteilung von ^{59}Fe und ^{60}Co in den roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität nach 2 Stunden.

	normale Susp.		reticulocytenr. Susp.	
Fraktionen	^{59}Fe	^{60}Co	^{59}Fe	^{60}Co
Stroma	31,5	54,5	22,2	50
Zellfl.	26,4	7,2	3,4	7,4
Globin	3,7	9,1	1	18,5
Haem	16,4	1,4	49,5	2,5

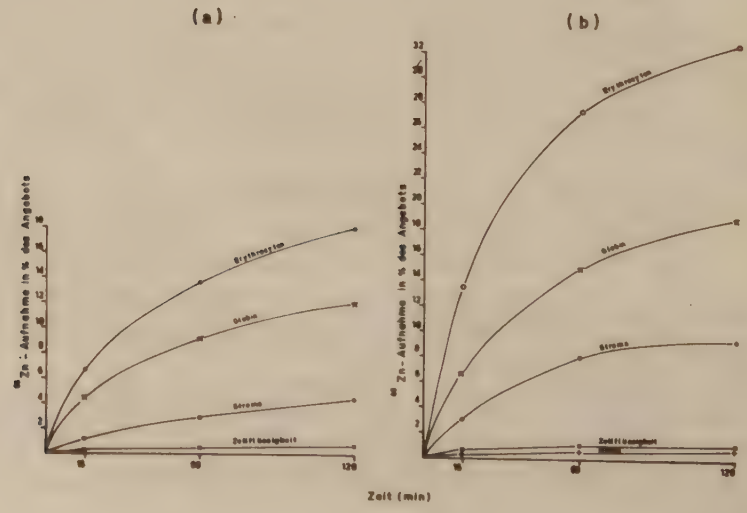
Die Zunahme der ^{60}Co-Aktivität in der Stromafraktion bzw. der Zellflüssigkeit von Zellen reticulocytenreicher Suspensionen, verglichen mit den Werten der Kontrollversuche, entspricht mit dem 3,1 bzw. 3,6-fachen etwa derjenigen der Gesamtaufnahme von ^{60}Co durch die Zellen. Die ^{60}Co-Aktivität in der Haemfraktion der Zellen ist sehr gering. Der Vergleich der Haemfraktionen beider Versuche besagt jedoch, daß eine statistisch gesicherte Zunahme um das 6fache der ^{60}Co-Aktivität in der Haemfraktion der Zellen reticulocytenreicher Suspensionen stattgefunden hat.

Vergleicht man die ^{60}Co-Aufnahme und Verteilung mit derjenigen von ^{59}Fe, dann kann festgestellt werden:
1. Die ^{60}Co-Aufnahme ist wesentlich geringer als die von ^{59}Fe. Sie beträgt bei den Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen gleichermaßen ca. 1/20 derjenigen von ^{59}Fe.
2. Wie ^{59}Fe wird auch ^{60}Co von den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen, verglichen mit den Zellen der Kontrollversuche vermehrt aufgenommen.

Abb. IV

^{65}Zn-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: TYrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37^{0}C; Versuchsdauer 2 Std.
Zinkangebot: ^{65}Zn ($ZnCl_2$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.
Ordinate: ^{65}Zn-Gehalt der Erythrocyten (O), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x), der Globinfraktion (π) und der Hämfraktion (+) in % des Angebots. Die ^{65}Zn-Aktivität der Hämfraktion normaler Suspensionen ist in diesem Maßstab graphisch nicht darstellbar.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 6 - 8 Einzelversuchen (vgl. Tab. IV).



3. Wie ^{59}Fe wird auch ^{60}Co in der Zellmembran der roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen im Vergleich mit den Werten der Kontrollversuche vermehrt gebunden. Offensichtlich wird aber im Unterschied zu ^{59}Fe das in der Zellmembran gebundene ^{60}Co nur in geringem Umfange in die Zellen eingeschleust.

d) Zinkaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten normaler und reticulocytenreicher Suspensionen

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. IV zusammengefaßt und in Abb. IV graphisch dargestellt.

Die Aufnahme von ^{65}Zn verläuft zweiphasig. Zunächst erfolgt ein rascher Anstieg der ^{65}Zn-Aktivität in den Zellen; die ^{65}Zn-Aufnahme verlangsamt sich nach 60 Minuten, ist aber im Unterschied zu der Aufnahme von ^{60}Co nach 120 Minuten noch nicht abgeschlossen. Die roten Zellen normaler Suspensionen enthalten im Durchschnitt 18 % der insgesamt aufgenommenen ^{65}Zn-Aktivität. Der Hauptteil der ^{65}Zn-Aktivität befindet sich in der Globinfraktion, dann folgt die Stromafraktion; die Zellflüssigkeit und die Hämfraktion enthalten nur einen geringen Anteil der Radioaktivität. (vgl. Tab. 3)

Tab. 3: Vergleich der Verteilung von ^{59}Fe und ^{65}Zn in den roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität nach 2 Stunden.

	normale Susp.		reticulocytenr. Susp.	
Fraktionen	^{59}Fe	^{65}Zn	^{59}Fe	^{65}Zn
Stroma	31,5	25	22,2	29,1
Zellfl.	26,4	4,1	3,4	3,3
Globin	3,7	66,6	1	58,2
Häm	16,4	2,5	49,5	3,3

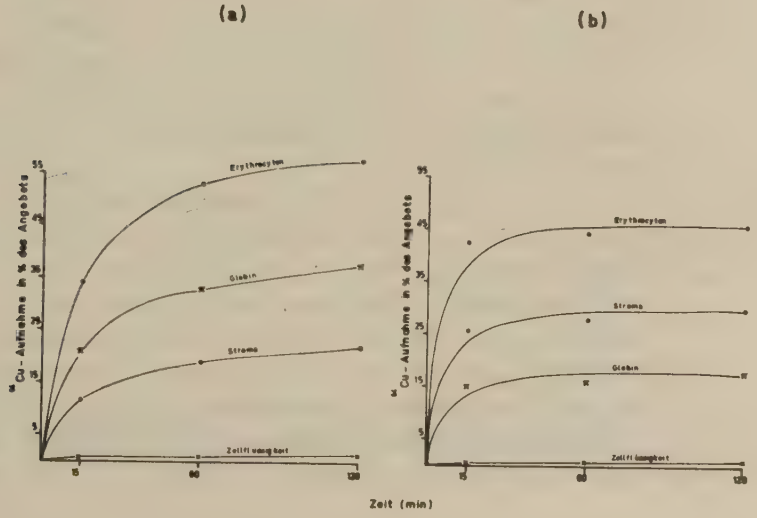
Die Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen nehmen fast doppelt so viel auf an ^{65}Zn wie die Zellen der Kontrollversuche. Auch hier befindet sich der Hauptteil der Radioaktivität in der Globinfraktion; allgemein ist festzustellen, daß die Verteilung des ^{65}Zn in den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen weitgehend derjenigen in den Zellen der normalen Suspensionen entspricht.
Die ^{65}Zn-Aktivität in der Stromafraktion der roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen ist doppelt so hoch wie diejenige in den gleichen Fraktionen der Zellen normaler Suspensionen. Auch in der Haemfraktion der Zellen reticulocytenreicher Suspensionen ist die ^{65}Zn-Aktivität verdoppelt im Vergleich mit den Werten der Haemfraktion der Kontrollversuche.
Trotz der Tatsache, daß die ^{65}Zn-Aktivität in der Haemfraktion sehr gering ist, sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Zunahme der ^{65}Zn-Aktivität in der Haemfraktion der roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen statistisch gesichert ist. Die ^{65}Zn-Aktivität in der Globinfraktion dieser Zellen ist im Vergleich mit derjenigen der Kontrollversuche um das 1,6fache angestiegen.

Vergleicht man die ^{65}Zn-Aufnahme und Verteilung mit der von ^{59}Fe, dann kann festgestellt werden:
1. Die ^{65}Zn-Aufnahme in die roten Zellen normaler Suspensionen ist gerade etwa in der gleichen Größenordnung wie diejenige von ^{59}Fe.
2. Die Zellen reticulocytenreicher Suspensionen nehmen im Vergleich mit den Werten der Zellen von normalen Suspensionen, genauso wie ^{59}Fe, auch vermehrt ^{65}Zn auf. Dabei ist die ^{59}Fe-Aufnahme etwa doppelt so groß wie diejenige von ^{65}Zn.

Abb. V

^{64}Cu-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Kupferangebot: ^{64}Cu ($CuSO_4$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.
Ordinate: ^{64}Cu-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (●), der Zellflüssigkeit (x) und der Globinfraktion (π) in % des Angebots. Die ^{64}Cu-Aktivitäten der Haemfraktionen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen waren in diesem Maßstab graphisch nicht darstellbar.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 8 Einzelversuchen (vgl. Tab. V).



3. Im Unterschied zur intracellulären Verteilung von ^{59}Fe ist der Hauptteil des ^{65}Zn in der Globinfraktion, das heißt mit hoher Wahrscheinlichkeit in Enzymproteinen, z. B. der Carboanhydrase, enthalten, die in dieser Fraktion ausgesalzt wurden.
4. Ebenso wie ^{59}Fe wird auch ^{65}Zn vor allem in der Zellmembran, aber auch im Häm der roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen in höherem Umfange gebunden als in den gleichen Fraktionen von Zellen normaler Suspensionen.

e) Kupferaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten normaler und reticulocytenreicher Suspensionen

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. V zusammengefaßt und in Abb. V graphisch dargestellt.

Die Aufnahme von ^{64}Cu erfolgt zunächst rasch, bis 15 Minuten nach Versuchsbeginn und wird von da an langsamer. Nach 120 Minuten finden sich in den roten Zellen normaler Suspensionen rund 57 % der angebotenen ^{64}Cu-Aktivität. Die Verteilung des ^{64}Cu im Zellinnern gleicht derjenigen von ^{65}Zn: Der überwiegende Anteil der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität befindet sich in der Globinfraktion, es folgt dann die Stromafraktion. In der Zellflüssigkeit und in der Hämfraktion sind nur geringe Mengen enthalten (vgl. Tab. 4).
Die roten Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen nehmen ^{64}Cu im Unterschied zu allen anderen bisher geprüften Metallen in geringerem Umfang auf: Am Versuchsende enthielten die roten Zellen 1/5 weniger ^{64}Cu-Aktivität als die Zellen normaler Suspensionen. Ein weiterer auffallender Unterschied zu der ^{64}Cu-Aufnahme durch normale Zellen besteht im zeitlichen Verlauf. Bei den roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen findet nach 15 Minuten

kein nennenswerter Zuwachs an ^{64}Cu-Aktivität mehr statt. Im Unterschied zu der ^{64}Cu-Verteilung in den Zellen normaler Suspensionen ist der Hauptteil der von den reticulocytenreichen Suspensionen aufgenommenen ^{64}Cu-Aktivität in der Stromafraktion. Der ^{64}Cu-Gehalt der Globinfraktion steht an zweiter Stelle. In der Zellflüssigkeit und in der Hämfraktion ist keine nennenswerte Radioaktivität enthalten (vgl. Tab. 4).

Tab. 4: Vergleich der Verteilung von ^{59}Fe und ^{64}Cu in den roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität nach 2 Stunden.

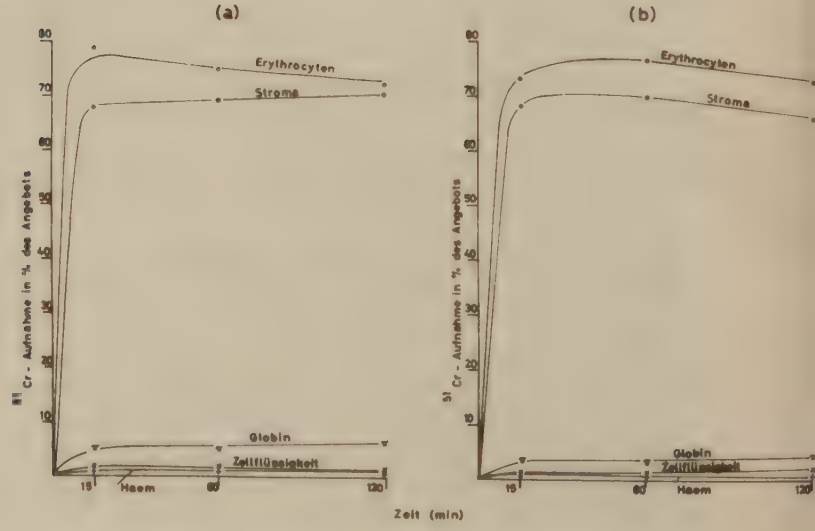
	normale Susp.		reticulocytenr. Susp.	
Fraktionen	^{59}Fe	^{64}Cu	^{59}Fe	^{64}Cu
Stroma	31,5	38,5	22,2	65,3
Zellfl.	26,4	1,2	3,4	0,8
Globin	3,7	60,3	1	39,4
Häm	16,4	1,7	49,5	2,4

Vergleicht man die ^{64}Cu-Aufnahme und Verteilung mit derjenigen von ^{59}Fe, dann ergibt sich folgendes Bild:
1. Die ^{64}Cu-Aufnahme durch normale Zellen ist 2,6 mal höher als die von ^{59}Fe. Bei den roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen kehren sich die Verhältnisse um: Die ^{59}Fe-Aufnahme ist hier 1,5 mal höher als diejenige von ^{64}Cu.
2. ^{64}Cu wird wie ^{59}Fe in den Membranen der roten Zellen vermehrt gebunden, wobei bei den roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen nach 15 Minuten eine bis zum 2-fachen erhöhte ^{64}Cu-Bindung in den Membranen im Vergleich zu den Kontrollversuchen beobachtet wurde.
3. Im Unterschied zu ^{59}Fe wird ^{64}Cu vor allem aber in der Globinfraktion gebunden, wo es wahrscheinlich als Erythrocuprein bzw. in Enzymproteinen gebunden zu sein

Abb. VI

^{51}Cr-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Chromangebot: ^{51}Cr ($CrCl_3$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.
Ordinate: ^{51}Cr-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x), der Haemfraktion (+) und der Globinfraktion (m) in % des Angebots.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 bis 12 Einzelversuchen (vgl. Tab. VI).



scheint, die in dieser Fraktion mit ausgefällt werden.

f) Chromaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der Tab. VI zusammengefaßt und in Abb. VI graphisch dargestellt.

^{51}Cr, in seiner dreiwertigen Form als $CrCl_3$ angeboten, wird von den roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen im gleichen Umfange aufgenommen. Die Aufnahme ist nach 15 Minuten abgeschlossen. Die roten Zellen enthalten am Versuchsende über 70 % der angebotenen Radioaktivität.
Auch die intracelluläre Verteilung von ^{51}Cr zeigt bei den Zellen beider Suspensionen keinen nennenswerten Unterschied. Der ganz überwiegende Anteil der aufgenommenen ^{51}Cr-Aktivität erscheint in der Stromafraktion, nämlich über 90 %. Nur geringfügige ^{51}Cr-Aktivitäten wurden noch in den Globinfraktionen gemessen. (vgl. Tab. 5)

Tab. 5: Vergleich der Verteilung von ^{59}Fe und ^{51}Cr in den roten Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität nach 2 Stunden.

	normale Susp.		reticulocytenr. Susp.	
Fraktionen	^{59}Fe	^{51}Cr	^{59}Fe	^{51}Cr
Stroma	31,5	97	22,2	91
Zellfl.	26,4	1,5	3,4	3
Globin	3,7	8,6	1	6,3
Häm	16,4	1	49,5	1

Im Vergleich mit der ^{59}Fe-Aufnahme und intracellulären Verteilung kann festgehalten werden, daß die ^{51}Cr-Aufnahme der Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen etwa so groß ist wie die ^{59}Fe-Aufnahme in die roten Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen. ^{51}Cr wird ganz überwiegend in den Zellmembranen der roten Zellen gebunden, wobei ebenfalls kein Unterschied in den Bindungswerten zwischen den Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen besteht.

Das wichtigste Ergebnis dieser Versuchsreihe ist darin zu sehen, daß offensichtlich die roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen aus dem Blut eisenverarmter Tiere nicht nur mehr Eisen aufnehmen, sondern auch die dem Eisen chemisch nahestehenden Metalle Mangan und Kobalt und sogar Zink, das keine chemische Verwandtschaft zum Eisen auszeichnet. Dieses Ergebnis wird besonders deutlich in der zusammengefaßten Darstellung der Tabelle 6, in der die Quotienten der r/n verzeichnet sind, die aus der Radioaktivität von Zellen bzw. Fraktionen reticulocytenreicher Suspensionen berechnet wurden.

Diesen Quotienten liegen die Werte der Tabellen I - VI zugrunde.

Tab. 6: Aufnahme und Verteilung verschiedener Biometalle nach 120 Minuten; aufgetragen wurde der Quotient

$$\frac{r}{n} = \frac{\text{Radioaktivität roter Zellen reticuloc. Susp.}}{\text{Radioaktivität roter Zellen normaler Susp.}}$$

Isotop	Gesamtaufnahme	Stromafr.	Globin+Zellfl.	Häm
^{59}Fe	3,4	2,3	0,5	10
^{54}Mn	2,3	3	2,1	11
^{60}Co	3,5	3,2	5,5	6,1
^{65}Zn	1,8	2,1	1,6	2,4
^{64}Cu	0,8	1,4	0,5	1
^{51}Cr	1	0,9	0,9	0,9

Die Aufnahme von Chrom durch die Zellen reticulocytenreicher Suspensionen ist gleich derjenigen, die mit Zellen normaler Suspensionen ermittelt wurde. Kupfer macht insofern eine Ausnahme, als die Zellen reticulocytenreicher Suspensionen von diesem Metall geringgradig weniger aufnahmen als die Zellen der Kontrollversuche. Die Ursache für diese Differenz ist unbekannt.

Der Tabelle 6 kann weiter entnommen werden, daß für alle Metalle, die von den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen vermehrt aufgenommen wurden, auch der Quotient r/n der Hämfraktion erhöht ist.

Methodisch kritische Überlegungen lassen es geraten erscheinen, eine Erhöhung des Quotienten r/n nur als Hinweis auf die Möglichkeit zu betrachten, daß derartige Porphyrin-Komplexe mit anderen Metallen außer Eisen gebildet werden können. Zur Erhärtung dieser Aussage, daß Reticulocyten neben Eisen auch Kobalt, Mangan und Zink in Porphyrin-Komplexe überführen, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wobei nach Reinigung der Metall-Porphyrin-Komplexe deren Identität festgestellt werden muß.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die Steigerung der Aufnahme der Metalle durch die Zellen reticulocytenreicher Suspensionen regelmäßig auch von einer erhöhten Bindung der Metalle in der Zellmembran begleitet ist.

Welche Bedeutung die Bindung von Eisen in der Membran für die nachfolgende Aufnahme ins Zellinnere zukommt, wurde ausführlich in einer vorhergehenden Publikation dargelegt (CRÜSEMANN 1968). Das Resultat der vorliegenden Untersuchungen besagt, daß offenbar die Bindungsstellen in der Membran nicht nur mit Eisen reagieren können, sondern auch mit anderen Metallen, die dem Eisen chemisch nahestehen. Die Tatsache, daß der Quotient r/n der Stromafraktionen für Mangan höher ist als für Eisen, ist darauf zurückzuführen, daß Eisen während des Versuches aus der Membran verschwindet

und ins Protoporphyrin eingebaut wird, was für die anderen Metalle nicht annähernd in dem gleichen Ausmaß wie für Eisen der Fall ist. (CRÜSEMANN 1968) Zu einem frühen Zeitpunkt, etwa 10 oder 20 Minuten nach Versuchsbeginn für Eisen (vgl. Tab. I), und 15 Minuten nach Versuchsbeginn für Mangan und Kobalt, (vgl. Tab. II und III) ist der Quotient r/n in der Stromafraktion etwa gleich groß. Die Metalle, die nicht im gleichen Umfange wie Eisen ins Protoporphyrin eingebaut werden, bleiben in der Membran zurück, oder penetrieren ins Zellinnere. Die Folge davon ist die Steigerung des Quotienten r/n für die in Tab. 6 vereinigten Fraktionen der Globinfraktion und der Zellflüssigkeit, die den Anteil der Metalle in den roten Zellen repräsentieren, die nicht an die partikulären Elemente und nicht Häm-gebunden sind.

2. Die Hemmung der Aufnahme von Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen in Gegenwart chemisch verwandter Biometalle und vice versa die Hemmung der Aufnahme von Biometallen durch Eisen

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß die roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen nicht nur mehr Eisen aufnehmen, sondern auch mehr von den chemisch dem Eisen verwandten Biometallen Kobalt und Mangan und sogar mehr von dem dem Eisen ferner stehenden Zink. Wie bei der Aufnahme von Eisen scheint auch für die Aufnahme der erwähnten Biometalle der Bindung in der Membran der Zellen als erstem Schritt eine besondere Bedeutung zuzukommen. Die Resultate legen den Schluß nahe, daß die Biometalle, die von den roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen wie Eisen vermehrt aufgenommen werden, wenigstens zum Teil, den gleichen Weg ins Zellinnere benutzen, wie Eisen. Wenn diese Annahme zutrifft, dann ist zu erwarten, daß die genannten Metalle mit Eisen um die Aufnahme konkurrieren.

Zur Prüfung der Frage, ob die Biometalle einander bei der Aufnahme in die roten Blutzellen behindern, wurden Versuche durchgeführt, in denen die roten Blutzellen nach 10 Minuten langer Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen von Mangan mit radioaktiv markiertem ^{59}Fe bzw. umgekehrt nach Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen von Eisen mit radioaktiv markiertem ^{54}Mn inkubiert wurden. Derartige Versuche wurden auch mit Eisen und Kobalt bzw. mit Eisen und Zink unternommen.

Um eventuelle Hemmeffekte deutlich sichtbar zu machen, wurden die Untersuchungen nur mit den roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen durchgeführt, bei denen die Aufnahme der erwähnten Metalle höher ist als bei den roten Zellen normaler Suspensionen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. VII - IX zusammengefaßt und in den Abb. VII - IX graphisch dargestellt.

Abb. VII

Die wechselseitige Hemmung der Aufnahme von Mangan und Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Ordinate: a) Die Hemmung der ^{54}Mn-Aufnahme durch Eisen
Manganangebot: ^{54}Mn ($MnCl_2$): 1,3 nMol/ml
In Gegenwart von $FeCl_3$: 0; 0,13 µMol/ml
b) Die Hemmung der ^{59}Fe-Aufnahme durch Mangan
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
In Gegenwart einer Mangankonzentration von 0; 0,65; 1,3 µMol/ml Suspensionsmedium.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen. (vgl. Tab. VII)

(a)

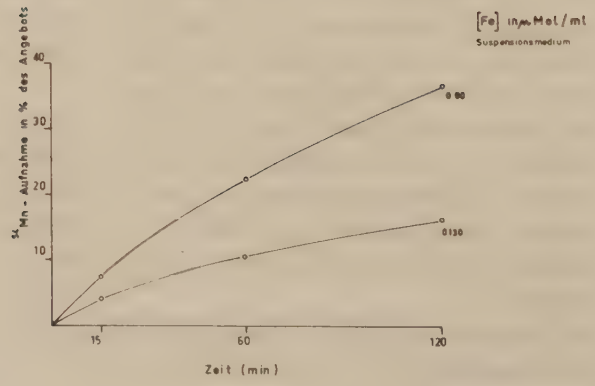


Abb. VII b

(b)

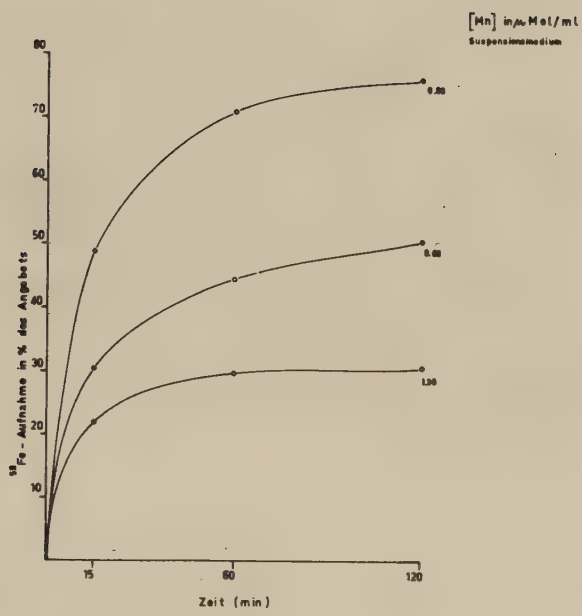

[Mn] in µ Mol/ml
Suspensionsmedium
80
70
60
50
40
30
20
10
^{59}Fe - Aufnahme in % des Angebots
15
60
120
Zeit (min)

Abb. VIII

Die wechselseitige Hemmung der Aufnahme von Kobalt und Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Ordinate: a) Die Hemmung der ^{60}Co-Aufnahme durch Eisen
Kobaltangebot: ^{60}Co ($CoCl_2$): 1,3 nMol/ml
In Gegenwart von $FeCl_3$: 0; 0,013; 0,260; 0,420 µMol/ml
b) Die Hemmung der ^{59}Fe-Aufnahme durch Kobalt
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
In Gegenwart einer Kobaltkonzentration von 0; 0,13; 1,3; 5,2 µMol/ml Suspensionsmedium.
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen. (vgl. Tab. VIII)

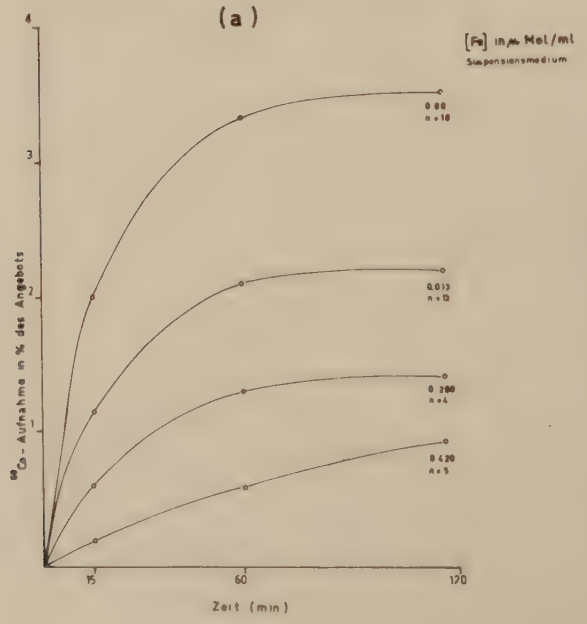


Abb. VIII b

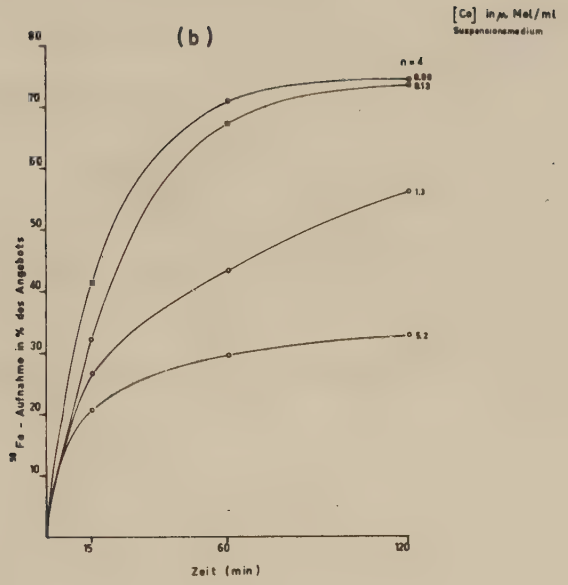

(b)
[Ca] in µ. Mol/ml
Suspensionsmedium
n = 4
8.89
8.13
1.3
5.2
90
70
50
40
30
20
10
59Fe - Aufnahme in % des Angebots
15
60
120
Zeit (min)

Abb. IX

Die wechselseitige Hemmung der Aufnahme von Zink und Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Ordinate: a) Die Hemmung der ^{65}Zn-Aufnahme durch Eisen
Zinkangebot: ^{65}Zn ($ZnCl_2$): 1,3 nMol/ml
In Gegenwart von $FeCl_3$: 0; 0,013; 0,390 µMol/ml
b) Die Hemmung der ^{59}Fe-Aufnahme durch Zink
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
In Gegenwart einer Zinkkonzentration von 0; 0,2; 1; 2 µMol/ml
Abszisse: Zeit in Minuten
Die Punkte sind die Mittelwerte aus 3 Einzelversuchen. (vgl. Tab. IX)

(a)

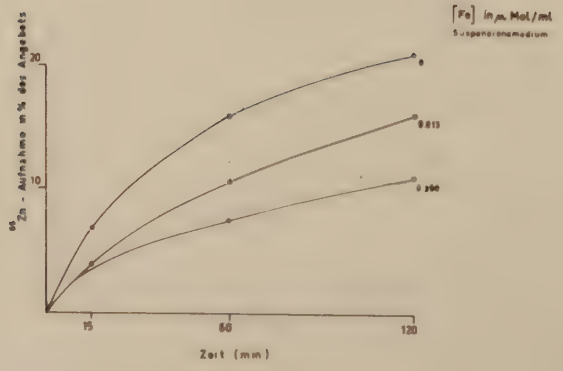
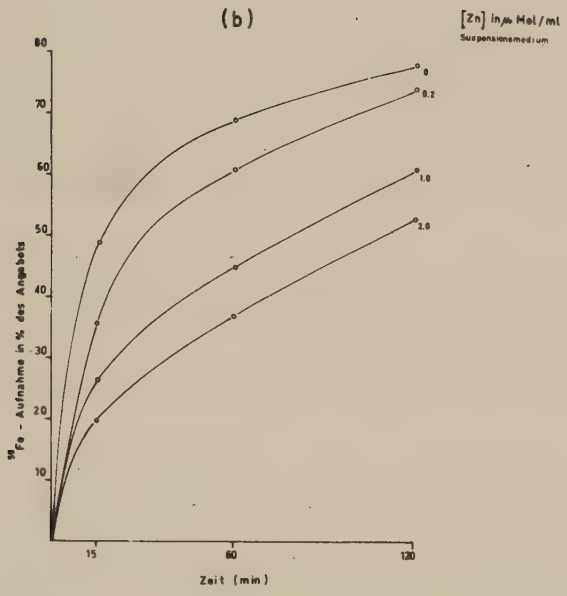


Abb. IX b


(b)
[Zn] in µ Mol / ml
Suspensionsmedium
0
0.2
1.0
2.0
80
70
60
50
40
30
20
10
^{59}Fe - Aufnahme in % des Angebots
15
60
120
Zeit (min)

Man kann den Abbildungen VII - IX mit einem Blick entnehmen, daß die für die Versuche ausgewählten Metalle, Eisen einerseits, Mangan, Kobalt und Zink andererseits, sich bei der Aufnahme in die roten Zellen gegenseitig hemmen. Die Zusammenstellung der Konzentrationen derjenigen Metalle, die nach 60 Minuten die Aufnahme eines der ausgewählten Biometalle gerade um etwa die Hälfte hemmen, ist in Tabelle 7 enthalten. Aus der Tab. 7 geht hervor, daß die Aufnahme von Mangan, Kobalt und Zink durch wesentlich niedrigere Konzentrationen von Eisen um 50 % erniedrigt wird, als umgekehrt für die Hemmung der Eisenaufnahme durch die gleichen Metalle nötig sind.

Die Kobaltkonzentration, die zur Hemmung der Eisenaufnahme um die Hälfte gebraucht wird, ist 15 mal größer als die Eisenkonzentration, die zur Hemmung der Kobaltaufnahme um den gleichen Betrag aufgewendet werden muß.
Die Konzentrationen von Mangan und Eisen stehen in dieser Hinsicht in einem Verhältnis von 10 : 1, und diejenigen von Zink und Eisen in einem Verhältnis von 5 : 1. Das Resultat dieser Versuchsreihe besagt demnach, daß an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen entsprechend der Erwartung, sich die Metalle, die wie Eisen vermehrt aufgenommen werden, bei der Aufnahme wechselseitig behindern.
Der Vergleich der Konzentrationen der Biometalle, die für eine 50 % Hemmung der Aufnahme eines anderen Metalls benötigt werden, besagt, daß die roten Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen offenbar eine weit höhere Avidität für Eisen als für Zink, Mangan oder Kobalt aufweisen.
Anzumerken ist noch, daß die erwähnte Reihenfolge der Avidität der roten Blutzellen für die Metalle: Eisen, Zink, Mangan und Kobalt identisch ist mit derjenigen, die man erhält, wenn man die Metalle der insgesamt aufgenommenen Menge nach geordnet aufzählt. (vgl. Abb. I-IV)

Tab. 7: Die Metallkonzentrationen zur wechselseitigen 50 %igen Hemmung der Aufnahme von Eisen und Mangan, Eisen und Kobalt und Eisen und Zink bei roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen (vgl. Tab. VII - IX).

Aufnahme von:	gehemmt durch:	Konzentration des hemmenden Metalls für die 50%ige Hemmung
^{54}Mn ($MnCl_2$)	Fe	0,13 µMol/ml
^{59}Fe ($FeCl_3$)	Mn	1,3 "
^{60}Co ($CoCl_2$)	Fe	0,260 "
^{59}Fe ($FeCl_3$)	Co	4,0 " *)
^{65}Zn ($ZnCl_2$)	Fe	0,390 "
^{59}Fe ($FeCl_3$)	Zn	2 "

*) Diese Konzentration ist durch Interpolation der in einem Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragenen Werte der Tab. VIII ermittelt worden.

Abb. X

^{59}Fe-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

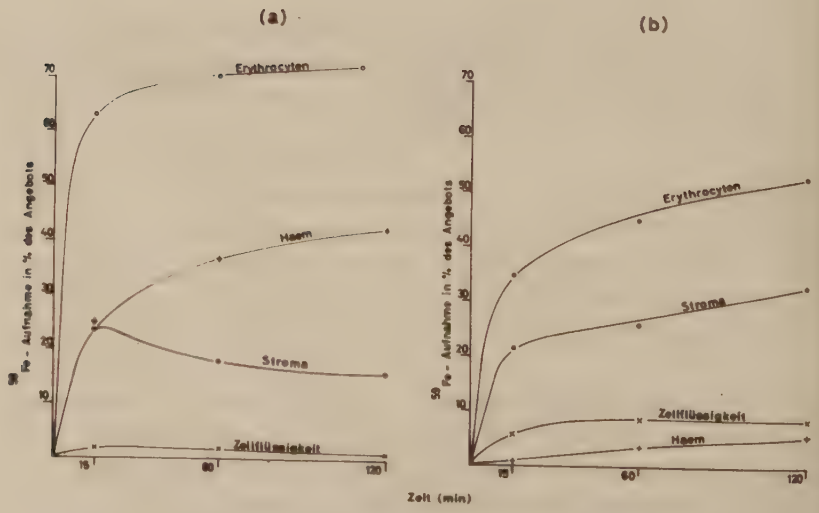
Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.

Ordinate: a) Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
b) Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
Kobaltkonzentration: 5,2 µMol/ml

^{59}Fe-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (●), der Zellflüssigkeit (x) und der Haemfraktion (+) in % des Angebots.

Abszisse: Zeit in Minuten

Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen. (vgl. Tab. X)



3. Intracelluläre Verteilung von Eisen und chemisch verwandter Biometalle bei wechselseitiger Hemmung der Metallaufnahme.

Die vorausgehenden Untersuchungen haben gezeigt, daß Metalle, die von den Zellen reticulocytenreicher Suspensionen im Vergleich mit normalen wie Eisen vermehrt aufgenommen werden, bei der Aufnahme mit Eisen konkurrieren. Die Untersuchungen geben indes keinen Aufschluß darüber, in welchem Teil des Aufnahmevorganges die Interferenz der Metalle mit Eisen stattfindet.
Einmal könnten die Biometalle gewissermaßen um die Bindungsstellen für Eisen in der Membran konkurrieren, zum anderen aber könnte die Interferenz erst in einer späteren Phase der Aufnahme ablaufen, etwa bei dem noch nicht aufgeklärten Vorgang der Überführung von Eisen ins Zellinnere bzw. bei der Hämoglobinsynthese (vgl. CRÜSEMANN 1968).
Zur Klärung der Frage, in welcher Phase der Aufnahme die Biometalle sich wechselseitig behindern, wurden die roten Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen in die einzelnen Zellfraktionen zerlegt. Derartige Versuche wurden bisher für Eisen und Kobalt bzw. für Eisen und Zink durchgeführt. Die Konzentrationen der inaktiven Metalle wurden aufgrund der in den Abbildungen VIII und IX verzeichneten Resultate so gewählt, daß nach 1 Stunde Inkubationszeit eine Hemmung der Aufnahme der radioaktiv markierten Metalle um 50 % zu erwarten war.
Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Tab. X - XIII und in den Abb. X - XIII zusammengefaßt, bzw. graphisch dargestellt.

a) Die wechselseitige Hemmung von Eisen und Kobalt.
Wie aus der Abbildung X zu entnehmen ist, hemmt Kobalt offenbar in erster Linie den Einbau von ^{59}Fe ins Protoporphyrin. Nach 120 Min. beträgt die im Häm gefun-

dene ^{59}Fe-Aktivität unter der Einwirkung von Kobalt nur rund 1/10 derjenigen, die ohne Kobaltzusatz gemessen wurde.
Entsprechend der geringen ^{59}Fe-Aufnahme unter diesen Bedingungen ins Protoporphyrin bleibt das radioaktiv markierte Eisen in der Stromafraktion gewissermaßen liegen. Während im Kontrollversuch der ^{59}Fe-Gehalt in der Stromafraktion im Laufe der Zeit abnimmt, wächst der ^{59}Fe-Gehalt dieser Fraktion in Gegenwart von Kobalt ständig an. Schließlich bleibt das nicht ins Protoporphyrin eingebaute ^{59}Fe im Zellinnern liegen. In Gegenwart von Kobalt ist die ^{59}Fe-Aktivität in den vergleichbaren Fraktionen der Zellflüssigkeit und des Globins gerade doppelt so hoch wie im Kontrollfall. (vgl. Tab. X)
Beide Vorgänge, die Ansammlung der ^{59}Fe-Aktivität in den vereinigten Fraktionen der Zellflüssigkeit und des Globins unter dem Einfluß von Kobalt werden besonders deutlich, wenn man den Gehalt der Radioaktivität der Fraktionen in % der insgesamt aufgenommenen Menge betrachtet. (vgl. Tab. 8)

Tab. 8: Eisenaufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen Werte: % der insgesamt aufgenommenen Aktivität von ^{59}Fe.

Kobaltzusatz:	———			5,2 µMol/ml Medium		
Zeit (min.)	15	60	120	15	60	120
Fraktionen:						
Stroma	39	25,6	21,8	62,8	58,3	63
Zellfl. + Gl.	5,5	3,9	2,6	19,1	20,8	17,5
Häm	37,2	52	59	3,2	8	10,2

Betrachtet man die Ergebnisse des Versuches, in dem gerade umgekehrt wie bisher die ^{60}Co-Aufnahme durch Eisenzusätze gehemmt wurde (Tab. XI und Abb. XI), dann ergeben sich folgende bemerkenswerte Unterschiede: Die ^{60}Co-Aktivität ist in Gegenwart von Eisen in erster Linie im Zellinnern, nämlich um 65 % und in der

Abb. XI

^{60}Co-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.

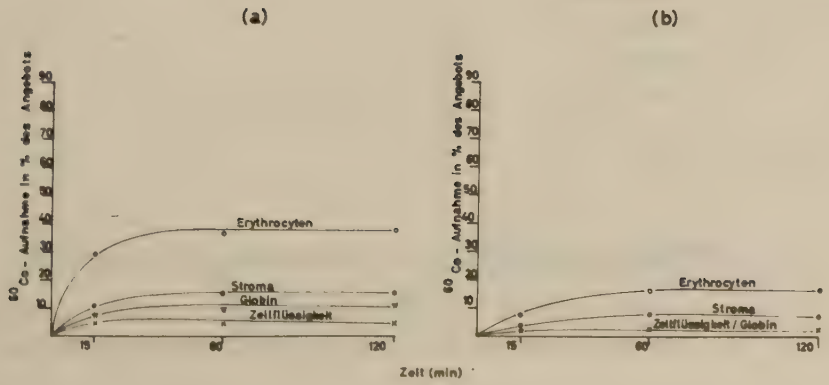
Ordinate: a) Kobaltangebot: ^{60}Co ($CoCl_2$): 1,3 nMol/ml

b) Kobaltangebot: ^{60}Co ($CoCl_2$): 1,3 nMol/ml
Eisenkonzentration: 0,130 µMol/ml

^{60}Co-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x) und der Globinfraktion (π) in % des Angebots. Die ^{60}Co-Aktivitäten der Haemfraktionen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen sind in diesem Maßstab nicht darstellbar.

Abszisse: Zeit in Minuten

Die Punkte sind die Mittelwerte aus 10 bis 11 Einzelversuchen. (vgl. Tab. XI)



Stromafraktion, nämlich um 50 % geringer als im Kontrollfall, in dem die ^{60}Co-Aufnahme ohne Zusatz von Eisen untersucht wurde. Da sich in diesen Fraktionen über 80 % der insgesamt aufgenommenen ^{60}Co-Aktivität befindet, fällt der Hinweis auf die verringerte ^{60}Co-Aktivität in der Hämfraktion nicht mehr sonderlich ins Gewicht. (vgl. Tab. 9 und Tab. XI)
Setzt man die insgesamt aufgenommene ^{60}Co-Aktivität gleich 100 %, dann ergibt sich hinsichtlich der Verteilung der ^{60}Co-Aktivitäten auf Stroma, Zellflüssigkeit und Globin und Häm keine besondere Abweichung von der Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen von Zellen, die ohne Eisenzusatz inkubiert wurden.
Mit anderen Worten heißt das, daß Eisen zwar die ^{60}Co-Aufnahme insgesamt erniedrigt, die Verteilung von ^{60}Co auf die wichtigsten Fraktionen der roten Blutzellen jedoch nicht verändert.

Tab. 9: Kobaltaufnahme und intracelluläre Verteilung an Erythrocyten reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen ^{60}Co-aktivität.

Eisenzusatz:	-----			0,260 µMol/ml		
Zeit (min.)	15	60	120	15	60	120
Fraktionen						
Stroma	37,8	41,5	42,2	45	51	46,8
Zellfl. u. Globin	39,9	37,6	42,7	35,3	34,6	33,2
Häm	2	2,2	2,4	1,2	1,8	0,6

b) Die wechselseitige Hemmung von Eisen und Zink

Die Verteilung der ^{59}Fe-Aktivität auf die verschiedenen Zellfraktionen bei Hemmung der Aufnahme durch

Abb. XII

^{59}Fe-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

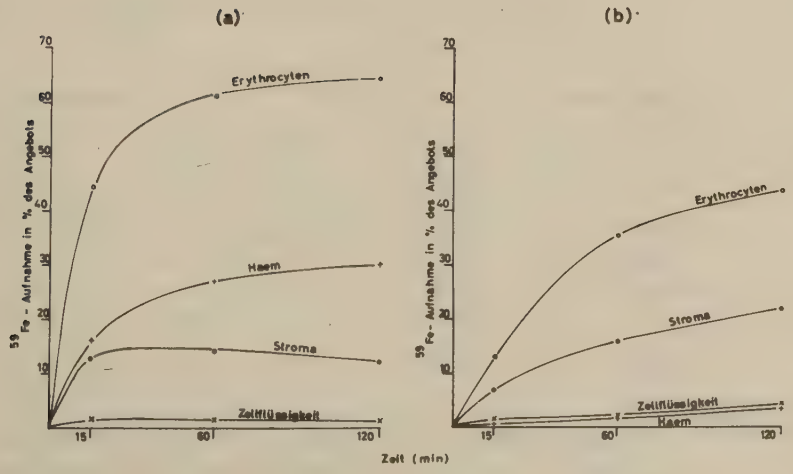
Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.

Ordinate: a) Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
b) Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml
Zinkkonzentration: 0,260 µMol/ml

^{59}Fe-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x) und der Haemfraktion (+) in % des Angebots.

Abszisse: Zeit in Minuten

Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen. (vgl. Tab. XII)



Zink gleicht im wesentlichen derjenigen, die sich in Gegenwart von Kobalt ergab.
Unter diesen Bedingungen hemmt auch Zink den Einbau von ^{59}Fe ins Protoporphyrin. (vgl. Tab. XII und Abb. XII) Dementsprechend nimmt die ^{59}Fe-Aktivität in der Stromafraktion nicht ab, sondern sie nimmt zu und ist am Versuchsende fast doppelt so hoch wie in der gleichen Fraktion von Zellen, die ohne Zinkzusatz inkubiert wurden.
Wie unter der Einwirkung von Kobalt wird ^{59}Fe, das nicht als Hämoglobineisen erscheint, auch unter der Einwirkung von Zink in der Zellflüssigkeit bzw. der Globinfraktion aufgestaut.
Das geht ganz deutlich aus der Gegenüberstellung der relativen Verteilung von ^{59}Fe auf die Zellfraktionen von Kontrollen und Versuchen hervor, in denen die Zellen in Gegenwart von Zink inkubiert wurden; dabei ist die insgesamt aufgenommene ^{59}Fe-Aktivität gleich 100 % gesetzt worden. (vgl. Tab. 10)

Tab. 10: Eisenaufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen Aktivität von ^{59}Fe.

Zinkzusatz:	------			2 µMol/ml		
Zeit (min.)	15	60	120	15	60	120
Fraktionen						
Stroma	28,5	23,2	18,9	54,5	45,5	50,5
Zellfl. u. Globin	5,4	3	2,7	16,9	9,8	13
Häm	36,8	44	46,5	5,4	6,8	8,4

Auch der umgekehrte Versuch (vgl. Tab. XIII und Abb. XIII), in dem die ^{65}Zn-Aufnahme durch Eisenzusatz gehemmt wurde, gleicht hinsichtlich des Resul-

Abb. XIII

^{65}Zn-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.

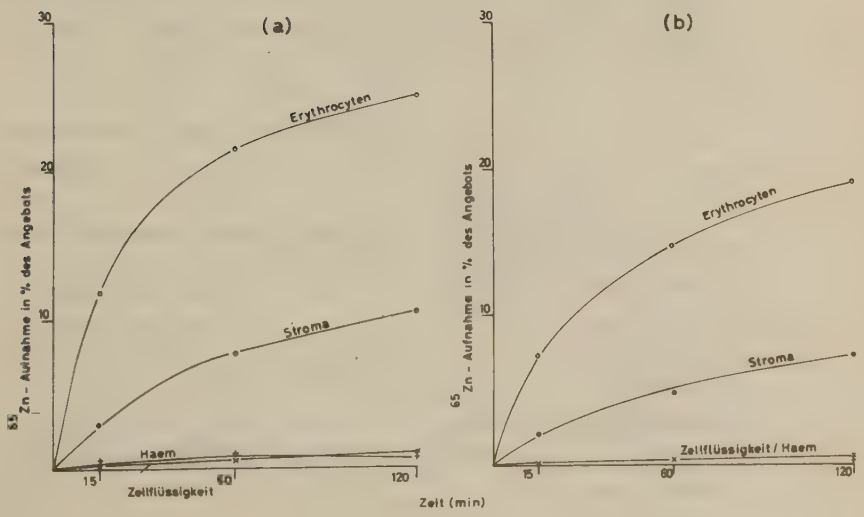
Ordinate: a) Zinkangebot: ^{65}Zn ($ZnCl_2$): 1,3 nMol/ml

b) Zinkangebot: ^{65}Zn ($ZnCl_2$): 1,3 nMol/ml
Eisenkonzentration: 0,130 µMol/ml

^{65}Zn-Gehalt der Erythrocyten (o), der Stromafraktion (•), der Zellflüssigkeit (x) und der Haemfraktion (+) in % des Angebots.

Abszisse: Zeit in Minuten

Die Punkte sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen. (vgl. Tab. XIII)



tates der Verteilung der Radioaktivität, im Prinzip dem Versuch, in dem die Aufnahme von ^{60}Co durch Eisen gehemmt wurde. Die verringerte ^{65}Zn-Aufnahme ist im wesentlichen durch eine geringere Bindung von ^{65}Zn in der Stromafraktion, aber auch durch eine geringe Aufnahme der ^{65}Zn-Aktivität in die Zellflüssigkeit bzw. die Globinfraktion bedingt. (vgl. Summe der ^{65}Zn-Aktivitäten in der Zellflüssigkeit und der Globinfraktion der Tab. XIII)
Demgegenüber fällt die unter diesen Bedingungen geringere ^{65}Zn-Aktivität in der Hämfraktion nicht ins Gewicht. Sie macht, auf die insgesamt aufgenommene ^{65}Zn-Menge bezogen, sowieso nur weniger als 2 % aus. Der Anteil der ^{65}Zn-Aktivität in der Stromafraktion und in den vereinigten Fraktionen von Globin und Zellflüssigkeit an der insgesamt aufgenommenen Menge, ist in Gegenwart von Eisen nicht wesentlich von demjenigen zu unterscheiden, der für rote Zellen berechnet wurde, die ohne Eisenzusatz inkubiert wurden. (vgl. Tab. 11)
Das bedeutet, daß auch die ^{65}Zn-Aufnahme - genau wie diejenige von ^{60}Co - durch Eisen zwar insgesamt erniedrigt wird, während die Verteilung auf die einzelnen Zellfraktionen unter diesen Bedingungen sich offensichtlich nicht ändert.

Tab. 11: Zinkaufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Zellen reticulocytenreicher Suspensionen.
Werte: % der insgesamt aufgenommenen ^{65}Zn-Aktivität.

Eisenzusatz:	----			0,390 µMol/ml		
Zeit (min.):	15	60	120	15	60	120
Fraktionen						
Stroma	26,4	35,6	42,3	29,4	33	39,1
Zellfl. u. Globin	55,4	57,2	64,1	54,7	51	55,8
Häm	3,1	3,9	3	2,2	2,2	2,1

E) DISKUSSION

Zum Verständnis der Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen sei die folgende Anmerkung vorausgeschickt. Die Untersuchungen wurden jeweils mit zwei Zellpopulationen durchgeführt, nämlich mit den roten Blutzellen normaler und denjenigen reticulocytenreicher Blutsuspensionen.
Es kann als erwiesen betrachtet werden, daß in beiden Zellpopulationen nur Reticulocyten, die unreifen Vorstufen der Erythrocyten, über die Fähigkeit verfügen, Eisen aufzunehmen und bei der Synthese von Hämoglobin zu verwerten (WALSH et al. 1949, JANDL et al. 1959). Mit anderen Worten heißt das, daß der Vergleich der Resultate, die mit beiden Zellpopulationen gewonnen wurden, dazu herangezogen wird, auf die Eigenschaften der Reticulocyten rückzuschließen. Die Fülle der Ergebnisse ist so groß, daß im Rahmen dieser Arbeit nicht auf alle Einzelheiten eingegangen werden kann. In dieser Hinsicht sei beispielsweise die unterschiedliche Kinetik der Aufnahme der verschiedenen Metalle erwähnt und die unterschiedliche Verteilung der Metalle auf die Zellfraktionen. Die Ursachen, die diesen Unterschieden zugrunde liegen, sind vorläufig unbekannt; ihre Aufklärung wird Anlaß zu weiteren Untersuchungen sein.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchung besagt, daß Reticulocyten nicht nur Eisen aufnehmen, sondern auch die dem Eisen chemisch verwandten Metalle Kobalt und Mangan und sogar das fernerstehende Zink. Daß es sich dabei nicht nur um einen unspezifischen Effekt handelt, der mehr oder weniger alle untersuchten Metalle gleichermaßen betrifft, dafür sprechen die andersartigen Ergebnisse der Versuche mit Chrom und Kupfer.

Chrom wird von den roten Zellen beider Populationen in gleichem Umfange aufgenommen, oder anders ausgedrückt, die Reticulocyten und die reifen Erythrocyten unterscheiden sich hinsichtlich des Gehaltes an Chrom nicht. Dies ist umso bemerkenswerter, als Chrom (III) offensichtlich auch von Transferrin, dem eisenbindenden Protein des Plasmas, gebunden wird (HOPKINS et SCHWARZ 1964, PERKINS 1966) und im Eisenmangel wie Eisen vermehrt resorbiert wird (HOPKINS et NOBLE 1969).

Die Ergebnisse lassen sich plausibel interpretieren, wenn man annimmt, daß Kobalt, Mangan und Zink bei der Aufnahme in die Reticulocyten, wenigstens zum Teil, auf dem gleichen Weg eingeschleust werden wie Eisen. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß die Reticulocyten - vergleichbar etwa den Vorgängen bei der Resorption von Eisen im Eisenmangel (Lit. siehe bei FORTH 1966, 1970) - die Biometalle Kobalt, Mangan und Zink bei der Inkorporation aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften gewissermaßen mit Eisen verwechseln.

Eine - wenn auch wenig wahrscheinliche - Alternative zu dieser Annahme wäre darin zu sehen, daß bei Reticulocyten nicht nur ein Mangel an Eisen, sondern auch an den anderen Metallen besteht. Dabei muß man sich vor Augen halten, daß durch die Art, wie die Reticulocytenzahlen bei den Kaninchen gesteigert wurden, nämlich durch wiederholte Aderlässe, Mangelzustände für eine Reihe wichtiger Biometalle hervorgerufen werden könnten. Das könnte für Zink, Mangan und Kupfer der Fall sein, die nicht nur in den roten Blutzellen enthalten sind (Wiss. Tabellen, Geigy), sondern als Bestandteile von Enzymen wichtige Funktionen im Zellstoffwechsel erfüllen.
Für Kobalt kann indes eine Verarmung der Reticulo-

cyten schwerlich angenommen werden, da bislang noch jeder Nachweis dafür fehlt, daß Kobalt außer als Porphyrin-Komplex Cobalamin = Vit. B_{12} überhaupt eine biologische Bedeutung hat.
Für Kupfer sind die Verhältnisse dadurch kompliziert, daß die Reticulocyten dieses Metall offenbar in geringerem Umfange inkorporieren als reife Erythrocyten.
Zur Deutung der Tatsache, daß Reticulocyten offenbar weniger Kupfer aufnehmen als reife Zellen, müßte man konsequenterweise schließen, daß Reticulocyten einen geringeren Bedarf an Kupfer haben. Dieser Schluß stößt insofern auf Widerspruch, als die Bedeutung des Kupfers für die Hämoglobinsynthese als erwiesen betrachtet werden kann. Ohne auf Einzelheiten einzugehen, sei soviel gesagt, daß die in der Literatur vorhandenen Befunde vorläufig vor allem eine Beteiligung Cu-haltiger Enzyme bei der Proteinsynthese wahrscheinlich machen (Lit. siehe bei ADELSTEIN & VALLEE 1962).
Da die de novo - Synthese von Globin auch in Reticulocyten vor sich geht (SHEMIN, LONDON & RITTENBERG 1950; KRUH & BORSOOK 1956; KASSENAAR, MORELL and LONDON 1957), ist die Annahme eines geringen Kupferbedarfes dieser Zellen im Vergleich mit reifen Erythrocyten, die kein Hämoglobin mehr bilden können, wenig überzeugend.

Die verringerte Aufnahme von Kupfer in die Reticulocyten könnte aber auch ganz einfach die Folge der bei diesen Zellen offensichtlich gesteigerten, d. h. festeren Bindung des Metalls in der Membran sein. Dementsprechend wird weniger Kupfer ins Zellinnere transferiert und erscheint deshalb auch in geringerem Grade als bei den roten Blutzellen normaler Suspensionen in der Globinfraktion. Das Resultat dieser Vorgänge ist der insgesamt geringere Gehalt an

Kupfer bei Reticulocyten im Vergleich mit demjenigen reifer Blutzellen.
In diesem Zusammenhang sei auf die Differenz hingewiesen, die zwischen den Zellen normaler und reticulocytenreicher Suspensionen hinsichtlich der zeitlichen Abhängigkeit der Aufnahme von Kupfer besteht. Bei den Zellen der reticulocytenreichen Suspensionen erinnert der Verlauf der Aufnahme, im Gegensatz zu dem bei Zellen normaler Suspensionen, an eine Adsorption des Kupfers. Möglicherweise ist dieser Unterschied die Folge einer höheren reduktiven Aktivität der Reticulocyten, die die Bildung von schwer löslichem Cu(I)-Oxyd nach sich zieht, das adsorptiv fixiert wird.
Die gesteigerte reduktive Aktivität könnte durchaus von Bedeutung für den Vorgang der Eisenaufnahme der Reticulocyten sein; dann nämlich, wenn es tatsächlich zutrifft, daß SH-Gruppen von Membranproteinen an dem Vorgang der Bindung und Einschleusung von Eisen ins Zellinnere beteiligt sind (FIELDING et al. 1969).
Zur Aufklärung des merkwürdigen Verhaltens von Reticulocyten hinsichtlich der Kupferinkorporation im Vergleich mit reifen Erythrocyten müssen zweifellos noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Einen höheren Grad an Wahrscheinlichkeit als die mögliche Verarmung an bestimmten Metallen hat - nicht nur für die Deutung der Versuche mit Kupfer, sondern auch für diejenigen der Versuche mit anderen Biometallen - die Annahme, daß die Reticulocyten über ein spezifisches System zur Einschleusung von Eisen verfügen, das offensichtlich auch mit Kobalt, Mangan und sogar Zink reagiert, nicht aber mit Kupfer. Auch in dieser Hinsicht sei auf die auffallende Parallele hingewiesen, die in der Eigenschaft der Mucosazellen des Darmes besteht. Im Eisenmangel steigt zwar auch

die Fähigkeit dieser Zellen zur Aufnahme und zum transzellulären Transport von Kobalt, Mangan und Zink an, nicht jedoch von Kupfer (FORTH 1966, 1970). Diese Interpretation, daß die Reticulocyten über ein System zur Einschleusung von Eisen ins Zellinnere verfügen, das auch mit anderen Metallen reagieren kann, wird ganz wesentlich durch die Tatsache unterstützt, daß für die Biometalle, die wie Eisen in die Reticulocyten aufgenommen werden, nämlich Kobalt, Mangan und Zink, eine wechselseitige Hemmung bei der Inkorporation nachgewiesen werden konnte.

Die Frage, wie man sich die Interferenz der Biometalle bei der Inkorporation in die Reticulocyten erklären kann, ist nicht so einfach zu beantworten. Zum Verständnis sei der Vorgang der Eisenaufnahme in die Reticulocyten kurz skizziert.
Soweit heute bekannt, spielt bei der Aufnahme von Eisen die Membran, erste Kontaktstelle mit dem Reticulocyt, eine besondere Rolle. Übereinstimmende Resultate verschiedener Autoren (Lit. siehe bei KATZ und JANDL 1964; FORTH et al. 1967) weisen darauf hin, daß Eisen zunächst in der Membran der Reticulocyten gebunden wird. Dabei könnten Sulfhydrylgruppen in der Membran als Acceptorstellen von Bedeutung sein (FIELDING et al. 1969). Von da aus wird das Eisen auf einem noch nicht näher bekannten Weg ins Zellinnere geschleust. Ob der Transfer von Eisen ins Zellinnere per diffusionem vor sich geht (JANSEN et al. 1953) oder ob dabei möglicherweise ein Protein als Zwischenträger für Eisen zu den Stellen der Hämoglobinsynthese eine Rolle spielt, (ALLEN und JANDL 1960; GREENOUGH et al. 1962), ist noch nicht aufgeklärt. Der Transfer von Eisen aus der Membran ins Zellinnere scheint zum Teil von der sogenannten Na-K-abhängigen ATPase abhängig zu sein und ist - wenigstens teilweise - durch Ouabain hemmbar (WISE & ARCHDEACON 1965 und 1969). Das Enzym bzw. Enzym-

system, das für den Einbau von Eisen ins Protoporphyrin verantwortlich ist - heute meistens Ferrochelatase (RIMINGTON 1958) genannt - wurde aus der Partikelfraktion von Hämolysaten gewonnen (GOLDBERG et al. 1956 und 1959; KRÜGER et al. 1956; NEVE 1961). Die Tatsache, daß Stoffwechselgifte wie 2,4-Dinitrophenol oder Cyanid die Aufnahme von Eisen in Reticulocyten hemmen (YOSHIBA et al. 1958; JANDL et al. 1959; WISE and CARLSON 1966; CRÜSEMANN 1968), kann plausibel darauf zurückgeführt werden, daß die gleichen Inhibitoren offenbar direkt die Synthese von Hämoglobin im Hämolysat behindern (MINAKAMI et al. 1958). Dafür spricht, daß in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenol (10^{-4}Mol/l) in erster Linie der Einbau von Eisen ins Protoporphyrin betroffen ist (CRÜSEMANN 1968). Rein theoretisch betrachtet besteht auch die Möglichkeit, daß Stoffwechselgifte einen eventuell biochemisch abhängigen Transfermechanismus für Eisen von der Membran ins Zellinnere hemmen. Für diese Annahme gibt es indes zur Zeit noch keine experimentellen Belege.
Wahrscheinlich ist die Ferrochelatase wie bei Leberzellen (NISHIDA and LABBE 1959; LABBE and HUBBARD 1960) auch bei Reticulocyten in den Mitochondrien lokalisiert. Beiläufig sei erwähnt, daß trotz prinzipieller Übereinstimmung der Enzymsysteme aus Leberzellen und Reticulocyten offenbar hinsichtlich der Spezifität für einzelne Metalle (LABBE et HUBBARD 1961; OYAMA et al. 1961; HASHEGAWA 1970) Unterschiede bestehen.

Betrachtet man die Vorgänge bei der Inkorporation und der Verwertung von Eisen durch Reticulocyten, dann können Biometalle an wenigstens drei Stellen interferieren:

1. An der Zellmembran,
2. am Zwischenträger zwischen der Membran und den Mitochondrien, dem Ort der Hämoglobinsynthese und

3. beim Einbau von Eisen ins Protoporphyrin.
Hinweise auf die Interferenz der Biometalle mit Eisen ergeben sich beim Studium der intracellulären Verteilung. Die Wahl der Methode, das Aussalzen der unterschiedlich löslichen Proteine mit Ammoniumsulfat, bedingt, daß sich der hypothetische Zwischenträger für Eisen zwischen der Zellmembran und dem Zellinneren (vergl. Anmerkung zur Methode Seite 13) nicht erfassen läßt.

Die Resultate der hier vorgenommenen Zellfraktionierung lassen somit nur Rückschlüsse auf eine Interferenz der Biometalle mit Eisen an der Zellmembran und hinsichtlich des Einbaus ins Protoporphyrin zu.
Im Hinblick auf die Beurteilung der Daten der Stromafraktion sind insoweit Einschränkungen angebracht, als diese Fraktion, wiederum bedingt durch die Methode des Aussalzens, nicht nur Membranbestandteile enthält, sondern auch andere partikuläre Elemente wie Mitochondrien und Ribosomen. (Vergl. Anmerkung zur Methode Seite 13)
Mit anderen Worten heißt das, daß die Werte der Stromafraktion unter Umständen eine zu hohe Bindungsrate von Eisen in der Membran der Reticulocyten vortäuschen könnten. Versuche von ALLEN und JANDL 1960 haben gezeigt, daß die Mitochondrien von Kaninchenreticulocyten jedoch in keinem Zeitpunkt während einer Inkubationsperiode von einer Stunde mehr als 5 - 6 % der ^{59}Fe-Aktivität enthielten, die in der gesamten partikulären Fraktion enthalten war.
Das bedeutet, daß der Hauptanteil der in dieser Fraktion gemessenen ^{59}Fe-Aktivität auf die Membran der Reticulocyten entfällt.

Die Einschränkungen, die hinsichtlich der methodisch kritischen Beurteilung der Daten der Hämfraktion angebracht sind, wurden bereits oben (vergl.

Ergebnisse Seite 14) kurz umrissen. Trotzdem besagt die Betrachtung der intracellulären Verteilung der Biometalle, daß die Hämsynthese durchaus als Ort einer möglichen Interferenz mit Eisen in Frage kommt; Kobalt, Mangan und Zink wurden auch im Häm der Reticulocyten gefunden.
Dieser Befund stellt eine Bestätigung von älteren Erfahrungen dar, die an isolierten Enzymsytemen (Ferrochelatase) aus Reticulocyten in vitro gewonnen wurden, denen zufolge auch Kobalt und Zink ins Protoporphyrin eingebaut werden können, wenn auch in erheblich geringerem Ausmaß als Eisen (OYAMA et al. 1961).
Für Mangan sind Hinweise auf den Einbau dieses Metalls ins Protoporphyrin an Reticulocyten von Menschen (BORG & COTZIAS 1958) und Vögeln bekannt (NORRIS & KLEIN 1961).
Unter den hier vorliegenden Bedingungen betrug der Gehalt der Hämfraktion an Kobalt und Zink bei Reticulocyten nach 120 Minuten 0,2 bzw. 3,1 % desjenigen an Eisen. Am isolierten Enzymsystem erzielten OYAMA et al. 1961 einen Einbau von Kobalt und Zink, der 2 bzw. 10 % desjenigen von Eisen betrug. Die Differenz zwischen beiden Resultaten dürfte dadurch erklärt werden, daß die Ergebnisse an intakten Reticulocyten noch durch die unterschiedliche Aufnahmerate und Verteilung der beiden Metalle beeinflußt werden.

Rein theoretisch betrachtet könnte die Hemmung der Aufnahme und Inkorporation des einen Biometalls durch das andere demnach zwei Ursachen haben: Einmal könnte die Aufnahme des Metalls in die Membran der Reticulocyten gehemmt sein, weil die Bindungsstellen durch das konkurrierende Biometall besetzt sind.

Dementsprechend sind die Metallmengen, die ins Zellinnere eingeschleust werden können, geringer als in Abwesenheit eines konkurrierenden Metalls.
Die zweite Ursache für die Hemmung der Aufnahme eines Biometalls durch ein konkurrierendes Metall könnte aber auch darin bestehen, daß der Einbau des Biometalls ins Protoporphyrin blockiert ist. In diesem Fall wird das Biometall aus der Membran und oder der Zellflüssigkeit gewissermaßen nicht abgerufen. Sein Anteil bleibt unter diesen Bedingungen in diesen beiden Zellfraktionen entweder gleich, oder wächst sogar noch über denjenigen hinaus, den man bei Reticulocyten beobachten kann, bei denen die Metallaufnahme nicht gehemmt wurde.

Betrachtet man die intracelluläre Verteilung von Eisen, Kobalt und Zink in Gegenwart konkurrierender Biometalle, so muß man feststellen, daß tatsächlich beide Ursachen für die gehemmte Aufnahme zu diskutieren sind. Auffallend ist, daß die eine, zuletzt genannte Ursache, nämlich die Hemmung des Einbaus ins Protoporphyrin für Eisen im Vordergrund steht. Gleichgültig, ob die Aufnahme von Eisen durch Kobalt oder Zink verringert wird, immer ist bei den hier benutzten Konzentrationen der hemmenden Metalle in erster Linie der Eiseneinbau ins Protoporphyrin gestört und die Bindung im Stroma unbehindert.
Unter diesen Bedingungen nimmt - wie theoretisch zu erwarten war - der ^{59}Fe-Gehalt im Zellinnern (Summe der Globinfraktion und der Zellflüssigkeit) und vor allem in der Membran der Reticulocyten zu.
Die Ursache der Hemmung des Einbaus von Eisen in Gegenwart von Kobalt und Zink kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen nicht entnommen werden. Es liegt jedoch nahe in diesem Zusammenhang nicht nur an die Verdrängung des Eisens durch Kobalt und Zink an der Ferrochelatase zu denken.

Möglicherweise handelt es sich bei der Hemmung dieses Enzymsystems um einen unspezifischen Schwermetalleffekt, verglichen etwa demjenigen, den man auch unter der Bindung von Blei an Reticulocyten beobachten kann (ALLEN & JANDL 1960; JANDL et al. 1959). Ob eine unspezifische Schwermetallwirkung auch die Ursache der Verringerung des Kobalteinbaus bzw. desjenigen von Zink ins Protoporphyrin ist, oder ob diese Wirkung die Folge einer Verdrängung von Kobalt und Zink von dem für Eisen sehr spezifischen (OYAMA 1961) Enzymsystem ist, das den Einbau des Metalls ins Protoporphyrin katalysiert, muß vorerst offen bleiben.

Einen anderen Typ der Hemmung der Metallaufnahme zeigen die Reticulocyten, bei denen die Aufnahme von Kobalt und Zink in Gegenwart von Eisen untersucht wurde. Unter diesen Bedingungen ist der Einbau von Kobalt und Zink ins Protoporphyrin so gering, daß die Blockade dieses Vorganges keine nennenswerte Auswirkung auf die Inkorporation dieser Metalle ins Zellinnere haben kann. (Vergl. Tab. XI und XIII) Hier ist in erster Linie die Bindung von Kobalt und Zink in der Membran der Reticulocyten und Überführung dieser Metalle ins Zellinnere durch Eisen vermindert worden. Die Verringerung des Kobalt- bzw. Zinkanteils in der Stromafraktion und im Zellinneren entspricht etwa derjenigen, die für die insgesamt gemessene Aufnahme von Kobalt und Zink unter diesen Bedingungen resultieren. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß zwischen der in der Membran gebundenen Menge eines Metalls und der ins Zellinnere eingeschleusten eine feste Beziehung existiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen darauf schließen, daß in der Membran der Reticulocyten, neben unspezifischen Bindungsstellen für Metalle,

ein System existiert, das mit hoher Spezifität Eisen binden und ins Zellinnere einschleusen kann. Dieses System reagiert auch mit anderen Biometallen, die dem Eisen ähnliche chemische Eigenschaften besitzen. Die hohe Spezifität für Eisen geht einmal aus der höchsten Bindungsrate von Eisen in der Membran von Reticulocyten im Vergleich mit derjenigen anderer Metalle hervor (vergl. Tab. I). Sie wird aber auch dadurch belegt, daß Kobalt und Zink, ohne die Bindung von Eisen in der Membran zu behindern, den Einbau von Eisen ins Protoporphyrin hemmen und zwar unspezifisch, wahrscheinlich aufgrund einer Schwermetallwirkung.

Umgekehrt hemmt Eisen schon in geringen Konzentrationen die Bindung von Kobalt und Zink in der Membran und damit die nachfolgende Einschleusung der Metalle ins Zellinnere. Es scheint geradzu kennzeichnend zu sein für die hohe Spezifität mit der Reticulocyten Eisen aufnehmen, das immer dann, wenn Eisen zur Hemmung der Aufnahme von Kobalt und Zink benutzt wird, vornehmlich die Vorgänge bei der Bindung in der Membran bzw. beim Transfer der Metalle ins Zellinnere betroffen sind, während umgekehrt bei der Hemmung der Eisenaufnahme durch Zink und Kobalt die Vorgänge bei der Inkorporation ins Zellinnere weniger in Mitleidenschaft gezogen werden als der enzymatisch gesteuerte Einbau von Eisen ins Protoporphyrin. Diese Wirkung von Kobalt und Zink dürfte, wie bereits erwähnt, eher die Folge einer unspezifischen Schwermetallwirkung sein.

Die eingangs gestellte Frage, ob Eisen etwa bei der Aufnahme in die Reticulocyten anderen, chemisch verwandten Metallen vorgezogen wird, kann aufgrund der hier vorgelegten Resultate bejaht werden. Die Mechanismen der bevorzugten Eisenbindung in der Membran der Reticulocyten und des nachfolgenden Transfers ins Zellinnere sind einst-

weilen noch unbekannt. Wahrscheinlich spielen jedoch Proteine in der Membran eine besondere Rolle bei diesen Vorgängen als Acceptorstellen für Eisen. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, daß der Gehalt an Proteinen in den Stromata von reifen Erythrocyten geringer ist als derjenige in den Stromafraktionen von Reticulocyten.
Der Lipidgehalt der Membranen beider Typen von roten Blutzellen scheint indes nur in geringem Umfang voneinander abzuweichen. Diese Beobachtungen wurden an Blutzellen von Hunden gemacht (TISHIKOFF et al. 1953).

Vergegenwärtigt man sich den Weg, den das Eisen im Organismus zurücklegen muß, bis es zu seinem hauptsächlichen Bestimmungsort, den Stellen der Hämoglobinsynthese, gelangt, und betrachtet man gleichzeitig die Mechanismen, derer sich der Organismus für den Transport von Eisen an diesen Bestimmungsort bedient, dann ist es nicht mehr so verwunderlich, daß trotz der Möglichkeit der Bildung von verschiedenen Metall-Porphyrin-Komplexen in den roten Blutzellen ausschließlich der Eisen-Porphyrin-Komplex, das Häm, vorliegt.
Eisen wird bei der Resorption chemisch verwandten Metallen wie Kobalt, Mangan, Zink und Kupfer vorgezogen (FORTH 1966; FORTH et al. 1966; FORTH 1970).
Eisen wird von Transferrin, jenem Protein, das für den Transport von Eisen an die Stätten der Blutneubildung verantwortlich ist und das physiologischerweise sein Eisen auch an Reticulocyten abgibt (KATZ and JANDL 1964) mit hoher Spezifität gebunden und anderen Biometallen vorgezogen.
(HOPKINS et SCHWARZ 1964; PERKINS 1966; GLIMSCHER et al. 1964; HOPKINS et NOBLE 1969)
Schließlich wird Eisen von Reticulocyten bevorzugt gegenüber anderen Biometallen aufgenommen, ins Zellinnere eingeschleust und bevorzugt ins Protoporphyrin eingebaut.

Die Ferrochelatase, das Enzym, das in Reticulocyten den Einbau von Metallen ins Protoporphyrin vermittelt, zeigt den höchsten Grad der Spezifität für Eisen (OYAMA et al. 1961).
Teleologisch betrachtet könnte man den Schluß ziehen, daß durch die erwähnten vorgeschalteten diskriminierenden Systeme offenbar sichergestellt werden soll, daß bei der Hämoglobinsynthese in den unreifen Vorstufen der Erythrocyten eventuell konkurrierende Metalle garnicht erst in Erscheinung treten.

F) TABELLENANHANG

Tab. I

^{59}Fe-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml mit Citronensäure in zehnfachem Überschuß.
Gemessen wurden die ^{59}Fe-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 - 12 Einzelversuchen.

(a)

Inkubationszeit:	15	20	60	120 (min.)
rote Zellen	452 ±85	610,2 ±141,3	1039,6 ±243	1120,4 ±265,6
Stroma	158,2 ±79,1	175,2 ±45,2	271,2 ±67,8	384,2 ±107,4
Zellflüssigkeit	141,2 ±39,6	180,8 ±67,8	293,8 ±45,2	322,1 ±158,2
Globin	11,3 ±5,6	5,6 ±5,6	73,4 ±96	45,2 ±62,2
Häm	22,6 ±5,6	33,9 ±22,6	118,6 ±62,1	197,7 ±90,4
% wiedergefunden in den vier Frakt.	74	73	73	78

(b)

Inkubationszeit:	15	20	60	120 (min.)
rote Zellen	1728,9 ±344,6	2655,5 ±395,5	3486,1 ±175,2	3955 ±158,2
Stroma	525,5 ±214,7	796,7 ±322	926,6 ±152,6	875,8 ±135,6
Zellflüssigkeit	175,2 ±56,5	203,4 ±45,2	209 ±56,5	135,6 ±45,2
Globin	62,2 ±62,2	45,2 ±28,3	56,5 ±22,6	45,2 ±17
Häm	519,8 ±56,5	898,4 ±395,5	1683,7 ±158,2	1955 ±101,7
% wiedergefunden in den vier Frakt.	73	73	81	75

Tab. II

^{54}Mn-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23%; Temperatur 37^{0}C; Versuchsdauer 2 Std.
Manganangebot: ^{54}Mn ($MnCl_2$): 1,3 nMol/ml
Gemessen wurden die ^{54}Mn-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 3 - 8 Einzelversuchen.

(a)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	143,5 ±28,3	409,6 ±48	582 ±316,4
Stroma	24,3 ±8,5	30 ±1,5	63,3 ±13
Zellflüssigkeit	84,2 ±20,3	228,2 ±28,3	572,9 ±22,6
Globin	2 ±1,7	3,9 ±3,4	5,6 ±9,6
Häm	3,2 ±0,5	3,8 ±0,4	7,6 ±10,7
% wiedergefunden in den vier Frakt.	80	65	78

(b)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	285,3 ±28,2	836,2 ±203,4	1372,9 ±118,6
Stroma	43,4 ±31	113 ±22,6	209 ±45,2
Zellflüssigkeit	133,3 ±73,4	404 ±79,1	638,4 ±84,1
Globin	37,3 ±6,2	16,4 ±44,1	48 ±55,3
Häm	19,2 ±8,5	52,5 ±31,6	82,5 ±24,9
% wiedergefunden in den vier Frakt.	82	70	71

Tab. III

^{60}Co-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Kobaltangebot: $^{60}Co(CoCl_2)$: 1,3 nMol/ml
Gemessen wurden die ^{60}Co-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 3 - 7 Einzelversuchen.

(a)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	48 ±3,4	63,3 ±2,3	62,2 ±4,5
Stroma	20,3 ±1,1	26 ±1,1	35 ±3,4
Zellflüssigkeit	9,6 ±14,2	9,6 ±4,5	4,5 ±1,1
Globin	6,8 ±1,7	8,5 ±6,8	5,6 ±4,5
Häm	0,5 ±0,5	0,3 ±0,05	0,9 ±2,8
% wiedergefunden in den vier Frakt.	78	70	77

(b)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	143,5 ±1,1	220,4 ±8,5	220,4 ±9
Stroma	72,9 ±4	101,7 ±3,4	110,2 ±4,5
Zellflüssigkeit	20,9 ±8,5	26 ±8,5	16,4 ±11,9
Globin	14,7 ±2,8	35 ±12,4	40,7 ±6,8
Häm	1,8 ±1,1	7 ±2,8	5,2 ±2,8
% wiedergefunden in den vier Frakt.	77	78	78

Tab. IV

^{65}Zn-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Zinkangebot: ^{65}Zn (ZnCl$_2$): 1,3 nMol/ml
Gemessen wurden die ^{65}Zn-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 6 - 8 Einzelversuchen.

(a)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	378,6 ±36,7	768,4 ±48	1017 ±29,4
Stroma	71,2 ±5,7	169,5 ±11,9	254,3 ±9,6
Zellflüssigkeit	14,1 ±5	25,4 ±4	42,4 ±11,9
Globin	254,3 ±26	519,8 ±5,7	678 ±45,2
Häm	6,2 ±2,3	18,6 ±6,2	25,4 ±11,9
% wiedergefunden in den vier Frakt.	91	95	98

(b)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	762,8 ±36,7	1548,1 ±62,1	1847,6 ±62,1
Stroma	180,8 ±17	452 ±34	536,8 ±18
Zellflüssigkeit	36,2 ±4,5	63,3 ±6,8	57,6 ±7,3
Globin	389,9 ±77,5	847,5 ±84,7	1073,5 ±67,8
Häm	30,5 ±5,6	49,2 ±4	60,5 ±7,3
% wiedergefunden in den vier Frakt.	84	91	93

Tab. V

^{64}Cu-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Kupferangebot: ^{64}Cu ($CuCl_2$ bzw. $CuSO_4$): 1,3 nMol/ml
Gemessen wurden die ^{64}Cu-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 8 Einzelversuchen.

(a)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	1921 ±107,3	2977,6 ±84,8	3248,8 ±73,5
Stroma	655,4 ±45,2	1079,2 ±84,8	1248,7 ±67,8
Zellflüssigkeit	18,1 ±1,7	37,9 ±6,8	39,6 ±1,7
Globin	1186,5 ±79,1	1842 ±135,6	2118,8 ±130
Häm	46,3 ±15,9	62,7 ±18,6	59,3 ±14,1
% wiedergefunden in den vier Frakt.	99	102	107

(b)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	2401,3 ±147	2514,3 ±84,8	2599 ±124,3
Stroma	1457,7 ±203,4	1582 ±101,8	1695 ±84,8
Zellflüssigkeit	29,4 ±5,1	23,7 ±4	21,5 ±2,2
Globin	858,8 ±15,8	915,3 ±84,8	1022,6 ±56,5
Häm	6,2 ±10,7	9,6 ±13	62,1 ±28,2
% wiedergefunden in den vier Frakt.	98	101	107

Tab. VI

^{51}Cr-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen normaler (a) und reticulocytenreicher (b) Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Chromangebot: ^{51}Cr ($CrCl_3$): 1,3 nMol/ml
Gemessen wurden die ^{51}Cr-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 - 12 Einzelversuchen.

(a)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	4463,5 ±384,2	4237,5 ±118,6	4068 ±248
Stroma	3853,3 ±327,7	3898,5 ±248,6	4350,5 ±305,1
Zellflüssigkeit	118,5 ±84,7	96,1 ±23,2	59,3 ±15,2
Globin	299,5 ±45,2	288,2 ±17	350,3 ±96
Häm	45,8 ±30	46,9 ±11,9	44,6 ±19,8
% wiedergefunden in den vier Frakt.	96	101	117

(b)

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	4124,5 ±683,7	4350,5 ±1130	4124,5 ±875,8
Stroma	3842 ±1056,5	4350,5 ±1356	3751,6 ±1164
Zellflüssigkeit	67,8 ±39,6	84,8 ±33,9	124,3 ±50,9
Globin	197,8 ±50,9	175,2 ±17	260 ±73,5
Häm	53,7 ±7,3	39,6 ±15,8	42,4 ±11,9
% wiedergefunden in den vier Frakt.	101	105	85

Tab. VII

Die wechselseitige Hemmung der Aufnahme von Mangan und Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Manganangebot: ^{54}Mn ($MnCl_2$): 1,3 nMol/ml. Suspensionsmedium.
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium mit Citronensäure in 10fachem Überschuß.
Gemessen wurden die ^{54}Mn- bzw. die ^{59}Fe-Aktivitäten der roten Zellen in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Blutzellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen.

a) ^{54}Mn-Aufnahme: in Gegenwart von Eisen
Eisenkonzentration: 0; 0,130 µMol/ml

Zeit (min.)	---	0,130
15	412,5 ±11,3	220,4 ±6,8
60	1265,6 ±19,8	593,3 ±16,4
120	2062,3 ±8,5	915,3 ±33,9

b) ^{59}Fe-Aufnahme: in Gegenwart von Mangan
Mangankonzentration: 0; 0,65; 1,3 µMol/ml

Zeit (min.)	---	0,65	1,3
15	2768,5 ±67,8	1723,5 ±231,6	1243,0 ±203,4
60	4011,5 ±45,2	2514,8 ±384,2	1638,5 ±180,8
120	4294,0 ±186,5	2853,3 ±429,4	1751,5 ±327,7

Tab. VIII

Die wechselseitige Hemmung der Aufnahme von Kobalt und Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.

Kobaltangebot: ^{60}Co ($CoCl_2$):1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.

Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.

Gemessen wurden die ^{60}Co- bzw. die ^{59}Fe-Aktivitäten der roten Zellen in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Blutzellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen.

a) ^{60}Co-Aufnahme: in Gegenwart von Eisen
Eisenkonzentration: 0; 0,013; 0,260; 0,420 µMol/ml

Zeit (min.)	---	0,013	0,260	0,420
15	113 ±39,6	65,0 ±45,2	33,9 ±3,4	10,7 ±1,7
60	187,6 ±45,2	115,6 ±33,9	73,5 ±7,3	32,8 ±13,6
120	197,8 ±56,5	124,3 ±45,2	79,1 ±45,2	52,5 ±19,8

b) ^{59}Fe-Aufnahme: in Gegenwart von Kobalt
Kobaltkonzentration: 0; 0,13; 1,3; 5,2 µMol/ml

Zeit (min.)	---	0,13	1,3	5,2
15	2344,8 ±152,6	1830,6 ±260,0	1525,5 ±124,3	1175,2 ±50,9
60	4011,5 ±45,2	3813,7 ±113	2457,8 ±209	1587,6 ±84,8
120	4231,8 ±248,6	4181 ±90,4	3181 ±209	1875,8 ±130

Tab. IX

Die wechselseitige Hemmung der Aufnahme von Zink und Eisen bei roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit 23 %; Temperatur 37°C;, Versuchsdauer 2 Std.

Zinkangebot: ^{65}Zn ($ZnCl_2$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml Suspensionsmedium.

Gemessen wurden die ^{65}Zn- bzw. die ^{59}Fe-Aktivitäten der roten Zellen in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Blutzellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlen sind die Mittelwerte aus 3 Einzelversuchen.

a) ^{65}Zn-Aufnahme: in Gegenwart von Eisen
Eisenkonzentration: 0; 0,013; 0,390 µMol/ml

Zeit (min.)	---	0,013	0,390
15	384,2 ±45,2	214,7 ±25,4	226 ±6,8
60	898,4 ±96	604,5 ±22,6	429,4 ±15,8
120	1175,2 ±124,3	898,3 ±79,1	621,5 ±17

b) ^{59}Fe-Aufnahme: In Gegenwart von Zink
Zinkkonzentration: 0; 0,2; 1; 2 µMol/ml

Zeit (min.)	---	0,2	1	2
15	2768,5 ±79,1	2034 ±45,2	1514,2 ±67,8	1130 ±37,8
60	3898,5 ±45,2	3446,5 ±84,7	2542,5 ±113	2090,5 ±50,9
120	4407 ±73,5	4181 ±96	3446,5 ±40,7	2994,5 ±79

Tab. X

^{59}Fe-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml mit Citronensäure in zehnfachem Überschuß.
Gemessen wurden die ^{59}Fe-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in µMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen.

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
a) ^{59}Fe-Aufnahme			
rote Zellen	3591,3 ±113	3955 ±113	4068 ±56,5
Stroma	1395,6 ±73,5	1011,4 ±39,6	887,1 ±11,3
Zellflüssigkeit	107,4 ±5,7	101,7 ±5,7	62,2 ±11,3
Globin	90,4 ±33,9	50,8 ±22,6	45,2 ±17
(Zellfl. und Globin	197,8	152,5	107,4)
Häm	1339,1 ±5,7	2056,6 ±169,5	2401,3 ±113
% wiedergefunden in den vier Frakt.	82	82	89
b) ^{59}Fe-Aufnahme in Gegenwart von $CoCl_2$: 5,2 µMol/ml			
rote Zellen	1960,6 ±75,2	2542,5 ±73,5	2994,5 ±113
Stroma	1231,7 ±56,5	1480,3 ±56,5	1887,1 ±67,8
Zellflüssigkeit	339 ±33,9	485,9 ±50,9	480,3 ±39,6
Globin	33,9 ±11,3	45,2 ±5,6	45,2 ±11,3
(Zellfl. und Globin	369,9	531,1	525,5)
Häm	62,2 ±11,3	203,4 ±50,9	305,1 ±84,7
% wiedergefunden in den vier Frakt.	85	87	93

Tab. XI

^{60}Co-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Kobaltangebot: $^{60}Co_{(CoCl_2)}$: 1,3 nMol/ml
Gemessen wurde die ^{60}Co-Aktivität der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurde in pMol/ml Zellen umgerechnet und ist mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 10 - 11 Einzelversuchen.

a) ^{60}Co-Aufnahme

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	167,2 ±35,1	206,8 ±26,6	211,9 ±19,2
Stroma	65,3 ±19,8	85,9 ±16,4	89,8 ±13
Zellflüssigkeit	27,7 ±6,8	26 ±9	27,7 ±1,7
Globin	39 ±21,5	52 ±11,9	62,7 ±23,2
(Zellfl. und Globin	66,7	78	90,4)
Häm	3,4 ±2,8	4,5 ±3,4	5,1 ±1,7
% wiedergefunden in den vier Frakt.	80	81	87

b) ^{60}Co-Aufnahme in Gegenwart von Eisen: 0,130 µMol/ml

Inkubationszeit:	15	60	120 (min)
rote Zellen	46,3	93,2	95,5
Stroma	20,9 ±4	48 ±15,2	44,6 ±11,3
Zellflüssigkeit	9,6 ±7,3	16,4 ±6,2	15,8 ±6,2
Globin	6,8 ±10,2	15,8 ±15,8	15,8 ±11,8
(Zellfl. und Globin	16,4	32,2	31,6)
Häm	0,6 ±0,6	1,7 ±0,6	0,6 ±1,1
% wiedergefunden in den vier Frakt.	82	88	80

Tab. XII

^{59}Fe-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37°C; Versuchsdauer 2 Std.
Eisenangebot: ^{59}Fe ($FeCl_3$): 1,3 nMol/ml mit Citronensäure in zehnfachem Überschuß über Fe.
Gemessen wurden die ^{59}Fe-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen.

a) ^{59}Fe-Aufnahme

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	2514,3 ±73,5	3446,5 ±209	3644,5 ±84,8
Stroma	717,6 ±22,6	802,3 ±62,2	689,3 ±39,6
Zellflüssigkeit	96,1 ±14,1	90,4 ±45,2	79,1 ±39,6
Globin	39,6 ±9,6	14,1 ±4,5	22,6 ±2,8
(Zellflüssigk. u. Gl.	135,7	104,5	101,7)
Häm	915,3 ±40,1	1514,2 ±29,4	1695 ±50,8
% wiedergefunden in den vier Frakt.	71	71	68

b) ^{59}Fe-Aufnahme in Gegenwart von Zink: 2 µMol/ml

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	745,8	2000	2486
Stroma	406,8 ±22,6	909,7 ±96,1	1254,3 ±45,2
Zellflüssigkeit	101,7 ±34	141,3 ±34	260 ±39,6
Globin	24,9 ±28,2	35 ±23,2	62,2 ±50,9
(Zellfl. und Globin	126,6	176,3	322,2)
Häm	40,7 ±12,4	135,6 ±22	209,1 ±30,5
% wiedergefunden in den vier Frakt.	77	65	72

Tab. XIII

^{65}Zn-Aufnahme und intracelluläre Verteilung an roten Blutzellen reticulocytenreicher Suspensionen

Suspensionsmedium: Tyrode- und Gelatinelösung (Haemaccel) im Verhältnis 1:1 gemischt; Haematokrit: 23%; Temperatur 37^{0}C; Versuchsdauer 2 Std.
Zinkangebot: ^{65}Zn ($ZnCl_2$): 1,3 nMol/ml
Gemessen wurden die ^{65}Zn-Aktivitäten der roten Zellen, der Stromafraktion, der Zellflüssigkeit, der Globinfraktion und der Hämfraktion in 1 ml Blutzellen. Sie wurden in pMol/ml Zellen umgerechnet und sind mit der Standardabweichung σ angegeben. Die Zahlenangaben sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen.

a) ^{65}Zn-Aufnahme

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	675,2 ±24,9	1220,4 ±45,2	1412,5 ±44,1
Stroma	178 ±24,9	435,1 ±18,8	599 ±25,4
Zellflüssigkeit	22,6 ±13	36,2 ±2,5	63,3 ±12,4
Globin	350,3 ±17,5	661 ±50,9	841,9 ±62,1
(Zellfl. und Globin	372,9	697,3	905,4)
Häm	20,3 ±6,8	47,5 ±39,6	43 ±7,9
% wiedergefunden in den vier Frakt.	85	95	105

b) ^{65}Zn-Aufnahme in Gegenwart von Eisen: 0,130 µMol/ml

Inkubationszeit:	15	60	120 (min.)
rote Zellen	423,8 ±16,4	839 ±31,6	1076,3 ±40,7
Stroma	124,3 ±36,1	276,9 ±22,1	421 ±33,9
Zellflüssigkeit	11,3 ±1,4	21,2 ±2,3	35 ±0,3
Globin	220,4 ±6,8	406,8 ±39,6	567,8 ±53,7
(Zellfl. und Globin	231,7	428	602,8)
Häm	9,6 ±2,3	18,1 ±5,1	22,6 ±2,3
% wiedergefunden in den vier Frakt.	89	83	96

G) LITERATUR

1. ADELSTEIN, S. J. and B. L. VALLE
   Copper
   in: Mineral Metabolism (C. L. COMAR & F. BRONNER, Eds.) Vol. II. p. 371
   Academic Press, New York and London (1962)

2. ALLEN, D. W. and J. H. JANDL
   Kinetics of intracellular iron in rabbit reticulocytes.
   Blood 15, 71 - 81 (1960)

3. BORG, D. C. and G. C. COTZIAS
   Incorporation of Manganese into Erythrocytes as Evidence for a Manganese Porphyrin in Man.
   Nature 182, 1677-79, (1958) II

4. CRÜSEMANN, D.
   Die Eisenaufnahme und intracelluläre Verteilung an Kaninchenerythrocyten unter dem Einfluß verschiedener Komplexbildner.

5. DOCUMENTA GEIGY
   Wissenschaftliche Tabellen S. 563, 1968

6. FIELDING, J., SHIRLEY, A. EDWARDS, and R. RYALL
   Effect of sulfhydryl inhibition on the uptake of transferrin-bounding iron by reticulocytes.
   J. Clin. Path., Vol. 22 (1969) 677

7. FORTH, W.
   Untersuchungen über die Resorption von Eisen und chemisch verwandten Schwermetallen an Därmen normaler und anämischer Ratten in vivo und in vitro; ein Beitrag zur Frage der Spezifität des eisenbindenden Systems in der Mucosa.
   Habil. Schrift. Homburg/Saar 1966

8. FORTH, W., W. RUMMEL, D. CRÜSEMANN und K. PFLEGER
Die Bedeutung der Bindung in der Zellmembran für die Eisenaufnahme der Reticulocyten.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 275 (1967)

9. FORTH, W., W. RUMMEL und P. J. BECKER
Die vergleichende Prüfung von Bindung und Durchtritt von Eisen, Kobalt und Kupfer durch isolierte Jejunumsegmente normaler und anämischer Ratten.
Med. Pharmacol. exp. 15, 179 (1966)

10. FORTH, W.
Absorption of iron and chemically related metals in vitro and in vivo; the specificity of an iron binding system in the intestinal mucosa of the rat.
in: C. F. MILLS (eds.), Trace element metabolism in animals, p. 298
E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, 1970

11. GLIMSCHER, M. J., KRANE, S. M./BETHESDA, Md.
Chrom (III) Binding to Serum Proteins, Specifically Siderophilin.
Biochem. Biophys. Acta 90, No. 3, 484-91/1964

12. GOLDBERG, A., H. ASHENBRUCKER, G. E. CARTWRIGHT and M. M. WINTROBE
Studies on the Biosynthesis of Heme in Vitro by Avian Erythrocytes.
Blood, 11 1956, II

13. GOLDBERG, A.
The Enzymic Formation of Haem by the Incorporation of Iron into Protoporphyrin; Importance of Ascorbic Acid, Ergothioneine and Glutathione.
Brit. J. Haemat., 1959, 5, 150

14. GREENBERGER, N. J., St. P. BALCERZAK and C. A. ACKERMAN
Iron uptake by isolated intestinal brush borders; Changes induced by alterations in iron stores.
J. Lab. Clin. Med. 73, 711 (1969)

15. GREENOUGH, W. B., PETERS, Th. and THOMAS, E. D.
An intracellular protein intermediate for hemoglobin formation.
J. Clin. Investig. 41, 1116 (1962)

16. HARRIS, J. W.
in: The red cell, p. 67
Harvard university press, Cambridge, Massachusetts 1963

17. HASHEGAWA, E., C. SMITH and T. R. TEPHLY
Induction of hepatic mitochondrial ferrochelatase by phenobarbital.
Bioch. Biophys. Res. Comm. 40, 517-23 (1970)

18. HOPKINS, L. L. and K. SCHWARZ
Chromium (III) binding to serum proteins, specifically siderophilin.
Biochim. Biophys. Acta 90, 484 (1964)

19. HOPKINS, L. L., Jr. and M. A. NOBLE
Effect of deficiency on orally administered Fe(III) upon the gastrointestinal uptake of ^{51}Cr(III) in rats.
Fed. Proc. 28, 229 (1969)

20. JANDL, J. H., J. K. INMAN, R. L. SIMMONS and D. W. ALLEN
Transfer of iron from serum iron-binding protein to human erythrocytes.
J. Cl. Investig. 38, 161 (1959)

21. JANDL, J. H. and J. H. KATZ
The plasma-to-cell cycle of transferrin.
Brit. J. Haematol. 9, 471 (1963)

22. JENSEN, W. N., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E. and WINTROBE, M. M.
The uptake in vitro of radioactiv iron by avian erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 42, 833 (1953)

23. KASSENAAR, A., H. MORELL and I. M. LONDON
The incorporation of glycin into globin and the synthesis of heme in vitro in duck erythrocytes.
J. Biol. Chem. 229 (1957)

24. KRUEGER, R. C., I. MELNICK and J. R. KLEIN
Formation of heme by broken-cell preparations of duck erythrocytes.
Arch. Biochem. and Biophys. 64, 302-10 (1956)

25. KRUH, J. and H. BORSOOK
Hemoglobinsynthesis in rabbit reticulocytes in vitro.
J. Biol. Chem. 220, 905 (1956)

26. LABBE, R. F. and N. HUBBARD
Preparation and properties of the iron-protoporphyrin chelating enzyme.
Biochim. Biophys. Acta, 41 (1960) 185-191

27. LABBE, R. F. and N. HUBBARD
Metal specificity of the iron-protoporphyrin chelating enzyme from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta, 52 (1961) 130-135

28. LEOPOLD, G., E. FURUKAWA, W. FORTH, H. HÜBERS
W. RUMMEL und J. SIMON
Die Bindung von Eisen und verschiedenen Biometallen an brush borders von Ratten.
Unveröffentlichte Befunde (1969)

29. MARTELL, A. E. und M. CALVIN
Die Chemie der Metallchelat-Verbindungen
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1958)

30. MINAKAMI, S., Y. KAGAWA et al.
The effects of inhibitors on ^{59}Fe-incorporation into heme by duck hemolysate.
J. Biochem., Vol. 45, II, 1958, 899

31. NEVE, R. A.
in: Haematin Enzymes (J. E. FALK, R. LEMBERG and R. K. MORTON, Eds.) p. 207
Pergamon press, London (1962)

32. NISHIDA, G. and R. F. LABBE
Heme biosynthesis on the incorporation of the iron into protoporphyrin.
Biochim. Biophys. Acta, 31 (1959)

33. NORRIS, G. R. and J. R. KLEIN
Incorporation of manganese into duck erythrocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 106, 228-229 (1961)

34. OYAMA, H., Y. SUGITA, Y. YONEYAMA, and H. YOSHIKAYA
Stoichiometry of heme synthesis by partially purified enzyme preparation from duck erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 47 (1961) 413-414

35. PERKINS, D. J.
The interaction of trivalent ions with human transferrin.
in: Protides in biological fluids.
Vol. 14 (1966) p. 83
(Peters Eds.) Elsevier publ. comp., Amsterdam

36. RIMINGTON, C.
Rev. pure appl. chem. 8, 129 (1958)
zit. nach: PORRA, R. J. and O. T. G. JONES
Studies on ferrochelatase
Biochem. J. 87, (1963)

37. RUGE, R. und W. RUMMEL
Beeinflussung der Urethanhämolyse durch Schwermetalle.
Arch. exp. Path. u. Pharmakol., Bd. 217,
S. 329-336 (1953)

38. SHEMIN, D., I. M. LONDON and D. RITTENBERG
The synthesis of protoporphyrin in vitro by red blood cells of the duck.
J. Biol. Chem., 183 (1950) 757-765

39. TEALE, F. W. J.
Cleavage of the heme-protein link by acid methylethylketon.
Biochim. Biophys. Acta, 35, 543 (1959)

40. TISHIKOFF, G. H., F. S. ROBSCHEIT-ROBBINS and G. H. WHIPPLE
Red cell stroma in dogs.
Blood 8: 459 (1953)

41. WALSH, R. J. et al.
Iron Metabolism. Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes.
Science 110, 396 (1949)

42. WEED, R. I. et al.
Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membrane.
J. Cl. Invest., 42, 581-588 (1963)

43. WISE, W. C. and J. W. ARCHDEACON
Sodium and potassium-activated ATPase in uptake of ^{59}Fe by the rabbit reticulocyte.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 118, No. 3, 653 (1965)

44. WISE, W. C. and J. W. ARCHDEACON
Accumulation of iron in the rabbit erythroid cell as affected by Ouabain, sodium and potassium ions and temperature.
J. gen. physiol. Vol. 53 (1969)

45. WISE, W. C. and L. D. CARLSON
Sodium dependent and ouabain sensitive iron movement into rabbit reticulocytes.
Fed. Proc. 25: 567, 1966

46. YOSHIBA, A. NAKAO, K.
The effects of inhibitors on the synthesis of hemoglobin in canine reticulocytes.
J. Biochem., Vol. 45, II (1958) 913-917

L E B E N S L A U F

Am 23. April 1942 wurde ich, Jürgen Simon, als Sohn der Eheleute Jakob Simon und Frau Elise, geb. Schneider in Gronig/Saar geboren.
Nach achtjährigem Volksschulbesuch in Gronig wechselte ich im Herbst 1956 auf das Aufbaugymnasium in Lebach/Saar über und legte dort im März 1962 die Reifeprüfung ab.
Vom 1. April 1962 bis Ende März 1964 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.
Mit dem Sommersemester 1964 nahm ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes auf. Hier bestand ich im Frühjahr 1965 das Vorphysikum und im Herbst 1966 das Physikum.
Mit dem Staatsexamen beendete ich im Dezember 1969 mein Studium.
Seit 1. Januar 1970 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakologie in Homburg/Saar.
Mit der Bearbeitung meines Promotionsthemas begann ich nach dem ersten klinischen Semester am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. W. Forth danke ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für seinen wissenschaftlichen Rat und großzügige Unterstützung in allen Fragen der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. W. Rummel bin ich für die freundliche Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und für die stete Förderung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.